

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
4 de Octubre de 2001 (04.10.2001)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 01/73088 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: C12N 15/82,
15/29, 5/10, A01H 5/00

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES01/00127

(22) Fecha de presentación internacional:
30 de Marzo de 2001 (30.03.2001)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P 200000814 31 de Marzo de 2000 (31.03.2000) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTIFICAS [ES/ES]; Calle Serrano, 117, E-28006
Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): GOMEZ
JIMENEZ, María Dolores [ES/ES]; Insto biología
molecular y celular de plantas primo yúfera, Consejo
Superior de Investigaciones Científicas, Campus Univ.
Politec., Avda. Los Naranjos, E-46022 Valencia (ES).
CAÑAS CLEMENTE, Luis Antonio [ES/ES]; Insto
biología molecular y celular de plantas primo yúfera, Con-
sejo Superior de Investigaciones Científicas, Campus Univ.
Politec., Avda. Los Naranjos, E-46022 Valencia (ES).
MADUEÑO ALBI, Francisco [ES/ES]; Insto biología
molecular y celular de plantas primo yúfera, Consejo

Superior de Investigaciones Científicas, Campus Univ.
Politec., Avda. Los Naranjos, E-46022 Valencia (ES).
BELTRAN PORTER, José Pio [ES/ES]; Insto biología
molecular y celular de plantas primo yúfera, Consejo
Superior de Investigaciones Científicas, Campus Univ.
Politec., Avda. Los Naranjos, E-46022 Valencia (ES).

(74) Mandatario: OJEDA GARCIA, Pedro; Consejo Su-
perior de Investigaciones Científicas, Calle Serrano, 113,
E-28006 Madrid (ES).

(81) Estados designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Estados designados (regional): patente ARIPO (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), patente
euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), patente OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: SEQUENCE REGULATING THE ANTHHER-SPECIFIC EXPRESSION OF A GENE AND ITS USE IN THE PRO-
DUCTION OF ANDROSTERILE PLANTS AND HYBRID SEEDS

(54) Título: SECUENCIA REGULADORA DE LA EXPRESION ESPECIFICA EN ANTERA DE UN GEN Y SU EMPLEO EN
LA PRODUCCION DE PLANTAS ANDROESTERILES Y SEMILLAS HIBRIDAS

(57) Abstract: The regulating sequence is useful for anther-specific expression of a nucleotide sequence of interest, for example, a
sequence whose expression is controlled by said regulating sequence that causes full ablation of the anther in the early stages of its
development and makes it possible to obtain androsterile plants which are useful for the production of hybrid seeds.

(57) Resumen: La secuencia reguladora es útil para la expresión específica de antera de una secuencia de nucleótidos de interés,
por ejemplo, una secuencia cuya expresión controlada bajo dicha secuencia reguladora causa ablación completa de la antera en los
primeros estadios de su desarrollo y permite obtener plantas androestériles útiles para producir semillas híbridas.



WO 01/73088 A1

SECUENCIA REGULADORA DE LA EXPRESIÓN ESPECÍFICA EN ANTERA DE UN GEN Y SU EMPLEO EN LA PRODUCCIÓN DE PLANTAS ANDROESTÉRILES Y SEMILLAS HÍBRIDAS

5 SECTOR DE LA TÉCNICA

Agricultura. Esta invención se relaciona con la obtención de secuencias de DNA reguladoras (promotores) y la construcción, usando dichas secuencias, de nuevos genes quiméricos capaces de expresarse de forma específica en las anteras de plantas transgénicas. La invención también se refiere a la obtención de plantas androestériles y
10 semillas híbridas.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Para provocar la expresión específica de determinados genes en las anteras de plantas transgénicas, se han aislado, caracterizado y utilizado diversos promotores de genes
15 cuya expresión es específica en un determinado tejido de la antera. Algunos de ellos se han utilizado en técnicas de ablación celular para producir plantas estériles de gran utilidad para la producción de semillas híbridas. En la actualidad, la ablación genética de células vegetales está siendo utilizada para realizar estudios de función y señalización celular dentro de tejidos u órganos específicos y para generar androesterilidad.

20 La ablación genética se basa en la inducción de la muerte celular mediante la expresión de cualquier enzima que sea capaz de destruir la integridad celular como proteasas, lipasas y RNasas (p.e. barnasa y RNasa T1). Resultados equivalentes pueden obtenerse expresando sustancias tóxicas para las células [Day CD e Irish VF. Trends Plant Sci., 2: 106-111, 1997]. Un ejemplo de este último método es el uso de péptidos que
25 inactivan los ribosomas como es el caso de la cadena A de la toxina de *Corynebacterium diphtheria* (DTA) y de la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*. Varios grupos han sugerido la producción de androesterilidad *via* una sobreproducción de reguladores de crecimiento. La síntesis de auxinas o citoquininas usando genes de origen no vegetal, tal como los genes 1 y 2 del plasmido Ti, o los genes *rol A, B* y *C* del plásmido Ri, representan

métodos donde estos factores se convierten en toxinas por la magnitud y momento inadecuado de su expresión.

También se han desarrollado métodos que no destruyen el tejido directamente, sino que dan lugar a células susceptibles a agentes ablativos específicos. Un ejemplo de esta aproximación es el uso de un RNA "antisentido" de un gen previamente establecido y que confiere resistencia constitutiva a un agente químico, como por ejemplo la tolerancia a un herbicida (Fabijanski SF *et al.*, *In vitro Cell. Dev. Biol.* 28: 46-52, 1992]. El efecto del RNA "en antisentido" es eliminar la resistencia química de forma específica, por ejemplo en polen, para que la aplicación del herbicida produzca la destrucción del polen. Este método convierte a un herbicida en un gametocida.

Para obtener una eficiente ablación genética es crucial disponer de un gen citotóxico que actúe sólo allí donde se exprese y de un promotor apropiado que controle la expresión espacio-temporal del gen citotóxico. Por ello, la caracterización de promotores de genes activos en diferentes tipos celulares y/o en diferentes momentos durante la diferenciación de la antera ha permitido examinar las funciones de distintos tejidos de la antera durante la gametogénesis mediante ablación celular [Mariani C *et al.* *Nature*, 347: 737-741, 1990; Paul W *et al.*, *Plant Mol. Biol.*, 19: 611-622, 1992; Hird DL *et al.*, *Plant J.*, 4: 1023-1033, 1993], con particular énfasis en las interacciones célula a célula [Roberts MR *et al.*, *Sex. Plant Reprod.*, 8: 299-307, 1995]. Así mismo, esta técnica está siendo empleada por grandes empresas productoras de semillas para el desarrollo de androesterilidad, característica deseable en los procesos de obtención de semillas híbridas [Williams ME, *Trends Biotechnol.*, 13: 344-349, 1995].

En varios trabajos se ha analizado la función de las interacciones célula a célula durante el desarrollo de las estructuras reproductoras. Por ejemplo, se han usado varios promotores diferentes para dirigir la expresión de un gen citotóxico en las células del *tapetum* en la antera con el objetivo de determinar el efecto de la ablación en el desarrollo del polen [Mariani C *et al.*, *Nature* 347: 737-741, 1990; Roberts MR *et al.*, *Sex. Plant Reprod.* 8:299-307, 1995]. La ablación de las células tapetales en diferentes estadios tiene efectos distintos en el desarrollo del polen. El uso de un promotor específico de células

tapetales de tabaco (*TA29*) dirigiendo la expresión del gen *barnasa* (ribonucleasa) durante el estadio de tétrada del desarrollo del polen provoca androesterilidad, lo que indica que el *tapetum* es esencial para la producción de polen viable en este estadio (Mariani C *et al.*, Nature 347: 737-741, 1990). En cambio, la sustitución del promotor *TA29* por el promotor

5 *APG* de *Arabidopsis*, específico de *tapetum* en el estadio de microspora del polen, no tiene ningún efecto sobre el polen [Roberts MR *et al.*, Sex. Plant Reprod. 8:299-307, 1995]. Este último dato indica que el *tapetum* no es esencial para la formación del polen a partir de la disgregación de las tétradas de microsporas. Un análisis histoquímico del desarrollo de la antera en plantas transgénicas de *Brassica* con la construcción *TA29-barnasa* mostró la

10 degradación del RNA dentro de las células tapetales junto con la desaparición del RNA de las microsporas [De Block M y Debrouwer D, Planta 189: 218-225, 1993]. Esta observación sugiere que las microsporas permanecen permeables a pequeñas moléculas después del inicio de la deposición de esporopolenina y en fases tardías de su desarrollo ya que el promotor *TA29* no dirige la expresión de genes en microsporas.

15 Beals TP y Goldberg RB [Plant Cell, 9: 1527-1545, 1997] pusieron en práctica una nueva estrategia de ablación celular para determinar qué tipos celulares de una antera están implicados en el proceso de dehiscencia. Transformaron plantas de tabaco con dos construcciones: la construcción formada por el promotor *TA56*, activo en el *septum*, en el estomio y en el tejido conectivo, y el gen *barnasa* junto con una de las siguientes

20 construcciones de forma alternativa: a) el promotor *TP12*, activo en la mayoría de los tejidos de la antera, junto con el gen *barstar* (inhibidor de la barnasa), b) el promotor *TA20*, activo en la mayoría de los tejidos de la antera pero con un patrón de distribución distinto al de *TA12*, y el gen *barstar* y c) el promotor del gen de la lectina de soja, activo en las células del tejido conectivo, del *septum* y del estomio, más el gen *barstar*. El análisis de los

25 diversos fenotipos de las plantas transgénicas demostró que el proceso de dehiscencia depende sólo de la presencia de un estomio funcional.

Shull [J. Ind. Abst. Vererb. 12: 97-149, 1914] fue el primero en introducir el término heterosis para describir las ventajas que ofrecía la heterocigosis con respecto a la división celular, crecimiento y otras actividades fisiológicas de un organismo. El resultado

30 de estas ventajas: incremento en tamaño, vigor, rendimiento, adelanto en la fructificación y

resistencia a enfermedades promovió hace décadas el interés por obtener variedades híbridas [Tsaftaris SA, *Physiol. Plantarum* 94: 362-370, 1995]. La mayoría de las plantas que contienen órganos reproductores tanto masculinos como femeninos se auto-polinizan (maíz, arroz, soja, tomate, etc.) lo que ocasiona problemas en los procesos de producción de semillas híbridas [Kriete G *et al.*, *Plant J.* 9: 809-818, 1996]. Para eludir este problema ha de usarse un sistema que controle la auto-polinización. Este sistema puede ser mecánico, químico o genético.

El sistema **mecánico** consiste en eliminar manualmente las anteras de las flores (emasculación), lo que supone una labor ardua y económicamente costosa.

El método **químico** se basa en el uso de productos químicos (gametocidas) que destruyen el polen específicamente produciendo una androesterilidad transitoria. Esta aproximación no es particularmente efectiva en cultivos con un periodo de floración muy extenso o con unas condiciones de floración variables e incontrolables. Además, la producción comercial de semillas híbridas *via* gametocidas se caracteriza por un elevado coste y relativa efectividad de los productos químicos.

La mayoría de los sistemas de producción de semillas híbridas comerciales se apoyan en métodos **genéticos** para controlar la floración, de forma que usan plantas auto-incompatibles o plantas androestériles, es decir, plantas que no producen polen, no son capaces de liberarlo o desarrollan polen que no es capaz de provocar auto-fertilización [Horner HT y Palmer RG, *Crop Sci.* 35: 1527-1535, 1995]. La producción de plantas androestériles es de gran utilidad para la obtención de semillas híbridas. La esterilidad masculina elimina la posibilidad de autofecundación de la planta, facilitando así la producción de híbridos los cuales son de gran aplicabilidad en los programas de mejora genética

Los métodos de obtención de semillas híbridas descritos hasta ahora tienen limitaciones y no son aplicables en cultivos importantes de interés agronómico. Actualmente, se están desarrollando nuevas estrategias basadas en ingeniería genética para conseguir plantas androestériles [Gates P, *Biotechnol. Genet. Engineering Rev.* 13: 181-195, 1994]. El desarrollo de métodos basados en el DNA recombinante y la caracterización de genes implicados en el desarrollo del polen ha permitido la proliferación de sistemas

moleculares que provocan androesterilidad nuclear (NMS), [Scott RJ *et al.*, Plant Sci. 80: 167-191, 1991]. Como ya se comentó anteriormente, la androesterilidad en los sistemas moleculares se consigue a través de procesos de ablación celular que impiden el desarrollo de las microsporas o los tejidos que conllevan su desarrollo (*tapetum* y paredes de los sacos polínicos). Además, es posible producir polen completamente funcional pero que no se libera a causa de defectos en la estructura de la antera. Para obtener plantas androestériles útiles en la producción de semillas híbridas es importante disponer de un promotor específico de tejidos implicados en el desarrollo del polen, un sistema para seleccionar la línea androestéril y un sistema para restaurar la androesterilidad en la línea híbrida F1.

10 **Promotores específicos**

El proceso de transcripción en la mayoría de los genes de plantas está controlado tanto temporal como espacialmente. La regulación de la actividad génica está mediada por la interacción entre factores en *trans* y los elementos regulatorios en *cis* presentes en la región promotora del gen. Así pues, un promotor es una secuencia de DNA que dirige la transcripción de un gen estructural y que por tanto está situada en su región 5'.

Los genes que se expresan exclusivamente en los órganos reproductivos de la flor (estambres y carpelos) son particularmente interesantes ya que sus promotores serían potencialmente capaces de dirigir la expresión de otros genes hacia dichos órganos y provocar esterilidad masculina o femenina en la flor. Este es el caso de algunos promotores de genes que se expresan específicamente en las anteras los cuales ya se han utilizado, en combinación con agentes ablativos que sólo afectan al polen en desarrollo, en abordajes biotecnológicos encaminados a la producción de plantas androestériles incapaces de autopolinizarse. Por tanto, este tipo de abordajes dependen en gran manera de la existencia de promotores que proporcionen una adecuada expresión. Durante los últimos años, se han aislado y caracterizado numerosos genes que se expresan específicamente en tejidos y células relacionados con el desarrollo del polen, por tanto, se dispone de promotores para tal fin [Scott RJ *et al.*, Plant Sci. 80: 167-191, 1991].

Los promotores que se eligen para expresar agentes tóxicos o degenerativos del tejido suelen ser promotores regulados por el desarrollo y suficientemente activos y específicos de las células diana. Si la diana celular es tejido tapetal, el promotor debe ser

activo tempranamente en el desarrollo de la microspora para romper el proceso antes de que las microsporas sean independientes del soporte del *tapetum*. Similarmente, el promotor debe de actuar antes de la segregación meiótica para impedir la ausencia de actividad degenerativa en parte de las microsporas si el gen letal es hemicigótico.

- 5 Una alternativa al uso de promotores regulados por el desarrollo es el uso de promotores inducibles. Sin embargo, el número de promotores descritos que muestran inducción química específica es muy limitado. El uso de un promotor inducible para bloquear el desarrollo del polen tiene ventajas a la hora de mantener e incrementar la línea femenina ya que las plantas son fértiles y pueden ser multiplicadas por autocruce. También
10 podrían usarse promotores activos constitutivamente o inducibles si la base de la androesterilidad reside en la supresión de un gen que se expresa en un tejido implicado en el desarrollo del polen, por ejemplo, *via* “antisentido”.

Selección de la línea androestéril.

- Para producir semillas híbridas en cantidades industriales es necesario incrementar
15 la línea femenina. Aunque es posible producir muchas plantas androestériles a través de propagación *in vitro*, para las plantas de interés agronómico esto sería económicamente demasiado costoso. Una estrategia común para multiplicar la línea androestéril es unir el gen ablativo a un gen que confiere resistencia a un herbicida [Mariani C *et al.*, Nature 357: 384-387, 1992]. Después de cruzar la línea androestéril con una línea isogénica y fértil, las
20 plantas que no han heredado la esterilidad son eliminadas con el herbicida. Por analogía, podría utilizarse cualquier gen que permitiera discriminar entre los dos fenotipos, como por ejemplo los que afectan a la pigmentación de las semillas.

Restauración de la fertilidad

- La restauración de la fertilidad en las plantas híbridas puede realizarse cruzándolas
25 con líneas transgénicas que expresen un inhibidor específico del enzima tóxico empleado para obtener androesterilidad, como es el caso del gen *barstar* cuyo producto inhibe la acción de la barnasa [Mariani C *et al.*, Nature 357: 384-387, 1992] o un RNA “en antisentido” del gen letal usado [Schmülling T *et al.*, Mol. Gen. Genet. 237: 385-394, 1993].

Sistemas moleculares usados para obtener plantas androestériles

La primera estrategia de ablación diseñada para producir androesterilidad fue propuesta por Mariani *et al.* [Nature 347: 737-741, 1990]. El promotor del gen *TA29* de tabaco, específico de *tapetum*, se usó para dirigir la expresión de dos diferentes RNAsas (RNasa T1 de *Aspergillus oryzae* y barnasa de *Bacillus amyloliquefaciens*) en tabaco y *Brassica napus*. Las anteras transgénicas androestériles que se obtuvieron carecían de *tapetum* y contenían los sacos polínicos sin microsporas o granos de polen. La construcción *TA29-barnasa* se fusionó al gen *bar*, un gen que confiere tolerancia al herbicida glufosinato amónico, para poder seleccionar las plantas androestériles en una población. La aplicación del herbicida a la progenie de un cruce elimina las plantas fértiles masculinas e incrementa así la eficiencia con la que las plantas estériles pueden aislarse. A pesar de todo, estas plantas transgénicas no eran mejores que los mutantes espontáneos si no existía la posibilidad de revertir la androesterilidad. Mariani *et al.* [Nature 357: 384-387, 1992] resolvieron este problema con la producción de plantas transgénicas con una construcción que contenía el gen inhibidor de la ribonucleasa barnasa (*barstar*) bajo el control del promotor *TA29*. Las plantas *TA29-barstar* actúan como una línea restauradora y cuando se cruzan con plantas transformadas con la construcción *TA29-barnasa* se obtienen plantas androfértiles.

Aparte de este sistema, la bibliografía recoge otros métodos de producción de líneas androestériles:

En *Petunia hybrida* la androesterilidad nuclear se provocó suprimiendo la síntesis de flavonoides en la antera, lo que impide la maduración del polen. Esto se consiguió de dos formas distintas: a través del efecto de un RNA “en antisentido” [van der Meer IM *et al.*, Plant Cell 4: 253-262, 1992] y de una co-supresión [Taylor LP y Jorgensen R, J. Hered. 83: 11-17, 1992] del gen de la chalconsintetasa, enzima implicado en la ruta de síntesis de flavonoides. Para restaurar la fertilidad se pueden aplicar flavonoides sobre el estigma o mezclados con el polen lo que permite multiplicar la línea androestéril por autopolinización y por tanto, obtener líneas homocigotas para el fenotipo androestéril que no requieren del uso de ningún marcador para su selección [Ylstra B *et al.*, Plant J. 6: 201-212, 1994].

En tabaco, la androesterilidad ha sido también inducida por la expresión del gen *rol C* de *Agrobacterium rhizogenes* fusionado al promotor *CaMV* 35S. Desafortunadamente, el fenotipo androestéril fue acompañado por otras alteraciones fenotípicas en la planta transgénica [Schmülling T *et al.*, EMBO J. 7: 2621-2629, 1988]. La restauración de la esterilidad se llevó a cabo por la expresión de un RNA “en antisentido” del gen *rol C* en los híbridos F1 [Schmülling T *et al.*, Mol. Gen. Genet. 237: 385-394, 1993].

O’Keefe *et al.* [Plant Physiol. 105: 473-482, 1994] describieron un sistema de androesterilidad inducible basado en la expresión del citocromo P450_{SU1} en las células tapetales de tabaco. Esta proteína es capaz de transformar un derivado inofensivo del gametocida R7402, añadido de forma exógena, en su forma activa (500 veces más tóxica). Sin embargo, posiblemente debido al rápido metabolismo de R7402, la androesterilidad es limitada a flores en un determinado estadio de desarrollo durante la aplicación del compuesto. Adicionalmente, R7402 es en sí mismo tóxico y comienza a inhibir el crecimiento cuando es aplicado en cantidades cuatro veces más altas que las usadas para producir androesterilidad de manera clásica.

Otro sistema de obtención de androesterilidad inducible se basa en la utilización del promotor *TA29* de *tapetum* junto con el gen *argE* de *E. coli*. El producto de este gen desacetila el compuesto N-acetil-L-fosfinotricina y lo transforma en glufosinato, un compuesto citotóxico. Cuando se aplica sobre la planta de tabaco la N-acetil-L-fosfinotricina el *tapetum* degenera y se obtienen plantas androestériles [Kriete G *et al.*, Plant J. 9: 809-818, 1996]. Por último, queremos indicar que la androesterilidad, además de ser una importante herramienta en la obtención de híbridos, es también una característica deseable en plantas capaces de desarrollar frutos en ausencia de fertilización (frutos partenocárpicos). En este tipo de frutos las semillas están ausentes con lo que se aumenta su consumo o su aceptación por los consumidores [Rotino G *et al.*, Nat. Biotechnol. 15: 1398-1401, 1997]. Algunos cultivos partenocárpicos de interés agronómico son: el peral, los cítricos, el pepino, la uva o los dátiles.

COMPENDIO DE LA INVENCION

La invención se enfrenta, en general, con el problema de desarrollar un sistema útil para producir androesterilidad en plantas.

La solución proporcionada por esta invención se basa en el aislamiento y
5 caracterización de un promotor capaz de dirigir la expresión específica de antera en estadios tempranos del desarrollo de la planta, en particular, el promotor del gen *END1* de guisante (*Pisum sativum* L.). El empleo de dicho promotor permite producir plantas transgénicas que expresen un gen específico en antera, por ejemplo, un gen que provoque la ablación de la antera y por tanto da lugar a una planta androestéril, de gran utilidad en programas de
10 mejora genética para la obtención de semillas híbridas. En el Ejemplo 1 se describe la obtención de plantas transgénicas que contienen diferentes construcciones que comprenden el promotor END1 fusionado a un gen marcador observándose su especificidad al dirigir la expresión de los genes marcadores en anteras. El Ejemplo 2 describe la obtención de plantas androestériles de *Arabidopsis thaliana* mediante el empleo del gen *barnasa*
15 mediante el control del promotor END1. Los resultados obtenidos muestran que dicha construcción provoca la ablación completa de las anteras desde estadios muy tempranos de su desarrollo, impidiendo la formación del polen en las mismas y produciendo la esterilidad masculina de la planta con un 100% de eficacia.

Por consiguiente, un objeto de esta invención lo constituye una secuencia de
20 nucleótidos reguladora de la expresión específica en antera de un gen que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 1, o un fragmento de la misma, o una secuencia de nucleótidos sustancialmente análoga a dichas secuencias. El empleo de dicha secuencia de nucleótidos para la obtención de plantas androestériles y semillas híbridas constituye un objeto adicional de esta invención.

25 Otro objeto adicional de esta invención lo constituye una construcción de DNA que comprende la totalidad o una parte de dicha secuencia de nucleótidos, así como un vector que contiene dicha secuencia o construcción de DNA y una célula transformada con dicho vector.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye el empleo de dicha secuencia
30 de DNA, o de dicha construcción de DNA, en la producción de plantas transgénicas que

expresan específicamente en anteras una secuencia de DNA de interés, por ejemplo, plantas transgénicas androestériles que expresan un polipéptido o RNA citotóxico cuya expresión induce la ablación de la antera. Las plantas transgénicas resultantes constituyen otro objeto adicional de esta invención.

- 5 Otro objeto adicional de esta invención lo constituye un método para producir semillas híbridas que comprende introducir en una planta dicha construcción de DNA.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

10 La Figura 1 muestra el análisis espacio-temporal de la expresión de *ENDI* en secciones longitudinales de flores de guisante en diferentes estadios. El precipitado de color púrpura señala la localización de la expresión. **A.** Yema floral en la que los primordios comunes (▲) todavía no se han diferenciado en primordios petaloides y estaminales junto con una flor en día 12 antes de la antesis donde comienza a expresarse *ENDI*. **B.** Flor en día 10 antes de la antesis. **C.** Control de la hibridación *in situ*: secciones hibridadas con la ribosonda “en sentido”. **D.** Flor en día 8 antes de la antesis. **E y F.** Flores en día 6 antes de la antesis fotografiadas con menor y mayor aumento respectivamente. **G y H.** Secciones seriadas de una flor en día 5 antes de la antesis hibridadas con la ribosonda “en sentido” (control) y “en antisentido” respectivamente. C, carpelo; E, estambres; P, pétalos; Co, tejido conectivo; M, microsporas; T, *tapetum*; 1, 2, 3 y 4, verticilos 1, 2, 3 y 4 de la flor.

20 La Figura 2 muestra la secuencia de la región promotora de *ENDI*. Aparecen de forma subrayada dos posibles cajas TATA (tataaat y tatatata), una caja CAAT y dos cajas CCAAT. En color azul se representan tres posibles cajas CArG, en verde un motivo GTCAAAA, un elemento ACGTCA en rosa y tres motivos C(A)_{6/8} en rojo. La caja GTCAAAA comparte sus últimos cinco nucleótidos con una de las cajas C(A)_{6/8}. La anotación +1 indica el inicio de la secuencia de cDNA del clon 162. En negrita se señala el codón de inicio de traducción (ATG). Se muestra, además, la secuencia deducida de aminoácidos. Los nucleótidos en negrita indican el codon de para de traducción (taa) y la posible señal de poliadenilación (aataaa).

25

La Figura 3 muestra el apilamiento de la secuencia consenso de unión a DNA de AGAMOUS (caja CArG más secuencias flanqueantes) con una putativa secuencia equivalente encontrada en la región promotora de *ENDI*.

La Figura 4 muestra una representación esquemática de las construcciones pBI101-F3 y pBI101-F1.5 utilizadas para transformar plantas de *Arabidopsis*, tabaco y tomate. El plásmido pBI101 empleado para realizar las construcciones consta de: el promotor constitutivo de la nopalina sintetasa (*nos-pro*) fusionado al gen *nptII* que confiere resistencia a kanamicina, el gen *uidA* que codifica el enzima β -glucuronidasa (GUS-intrón) y la señal de poliadenilación del gen de la nopalina sintetasa (*nos-ter*) en los extremos 3' de ambos genes.

La Figura 5 muestra los resultados de la expresión del promotor *ENDI* de guisante fusionado con el gen *uidA* (GUS-intrón) en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*. **A** y **B**: Tras realizar los correspondientes ensayos histoquímicos de actividad β -glucuronidasa (GUS) con flores en diferentes estadios de desarrollo, dicha actividad sólo se detectó en las anteras (azul) y nunca en otros órganos florales ni en el resto de la planta. **C**: Sección longitudinal de un estambre con actividad GUS incluido en parafina. La actividad GUS (azul) se aprecia en los tejidos que conforman la epidermis, el conectivo y el endotecio. No se detectó actividad GUS ni en el *tapetum* ni en el polen. Aunque en la figura algunos granos de polen aparecen azules se trata de un artefacto ya que sólo aparece la coloración azul en la cubierta de exina y nunca en su interior. Co: conectivo, En: endotecio, Ep: Epidermis.

La Figura 6 muestra los resultados de la expresión del promotor *ENDI* de guisante fusionado con el gen *uidA* (GUS-intrón) en plantas transgénicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*). **A**, **B** y **C**: Ensayos histoquímicos de actividad GUS en flores de tabaco en diferentes estadios de desarrollo mostrando actividad sólo en las anteras (azul). **D**: Sección transversal en fresco de una antera mostrando los granos de polen y restos del *tapetum* sin coloración azul. E: estambres, C: carpelo, P: pétalos, S: sépalos, Po: polen.

La Figura 7 muestra los resultados de la expresión del promotor *ENDI* de guisante fusionado con el gen *uidA* (GUS-intrón) en plantas transgénicas de tomate (*Lycopersicon esculentum*). **a**: Ensayos histoquímicos de actividad GUS en flores de

tomate mostrando actividad GUS específicamente en las anteras (St). **b:** Sección en parafina de una de dichas flores, la actividad GUS está restringida a los tejidos que conforman los sacos polínicos (epidermis, endotecio, conectivo, etc.) pero no existe en el *tapetum* ni en el polen. Se: sépalos, Pe: pétalos, St: estambres. Ca: carpelo, Ep: epidermis, Co: conectivo, En: endotecio, Tp: *tapetum* y Po: polen.

La Figura 8 muestra los resultados de la obtención de plantas de *Arabidopsis thaliana* con esterilidad masculina mediante la utilización del gen de la BARNASA dirigido por el promotor END1. **a:** Planta control de *Arabidopsis* (WT) mostrando las silicuas (flechas, recuadro izquierdo) formadas como consecuencia de la fertilización de sus ovarios con polen maduro. A su lado se ve una planta transgénica en la que se observan los efectos de la expresión del gen *barnasa* bajo el control del promotor END1: Los ovarios senescentes (recuadro derecha) permanecen en la planta al no haber sido polinizados (flechas). **b:** Flor normal de una planta salvaje de *Arabidopsis* tras la polinización del estigma mediante la dehiscencia de las anteras (estadio 14). Tras el proceso de maduración de la antera, el filamento ha sufrido una elongación hasta situar los sacos polínicos a la altura del estigma para facilitar su polinización. **c:** Flor de una planta transgénica en el mismo estadio mostrando los efectos de la BARNASA sobre el desarrollo de la antera. La ablación de la antera es completa no formándose los sacos polínicos. El filamento no sufre el proceso de elongación al no completarse el desarrollo de la antera. En estas condiciones la polinización es imposible produciéndose una esterilidad en la planta del 100%.

La Figura 9 muestra el resultado de los estudios mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de los tipos celulares presentes en las estructuras formadas en lugar de las anteras en plantas transgénicas que portan la construcción pEND1-barnasa. **a:** Estambre de una flor control de *Arabidopsis*. La flecha negra señala los tipos celulares presentes en la epidermis de la antera (bordes dentados) y la negra los del filamento (alargados). **b:** El mismo estambre visto desde el lado contrario. Se observa un cambio del tipo celular (más redondeado) en la zona de inserción del filamento con la antera (flecha). **c:** Estambre de una planta transgénica, se observan los tipos celulares presentes en el filamento y los redondeados de la zona de inserción, pero no los de la

epidermis de los sacos polínicos. **d**: Detalle de la estructura presente en la zona terminal del filamento en la que coexisten los tipos celulares alargados del filamento con los redondeados de la zona de inserción.

La Figura 10 muestra el resultado de los estudios histoquímicos sobre secciones en parafina de las estructuras formadas en lugar de las anteras en plantas transgénicas que portan la construcción pEND1-barnasa. **a**: Sección longitudinal de una flor control de *Arabidopsis* en un estadio temprano del desarrollo de la antera. En rojo se observa un grupo de células madre de las microsporas que darán lugar al polen maduro tras sucesivas divisiones. **b**: Antera control en un estadio más avanzado de desarrollo (12-10 13, antes de la dehiscencia) en el que se observa la casi desaparición del tapetum y el polen se encuentra en proceso de maduración (rojo). El filamento ha comenzado a elongarse. **c** y **d**: Secciones longitudinales de dos flores transgénicas en estadio 13 y 12 respectivamente en las cuales se observan las estructuras formadas en lugar de los estambres. En el interior del engrosamiento producido en la zona terminal se observa un 15 pequeño grupo de células madre del polen y quizás de *tapetum* externo (rojo) que han detenido su desarrollo (no hay divisiones). El filamento no se ha comenzado a elongar. **e**: Detalle de una de las estructuras mostradas en la figura **d** donde se observa con detalle el grupo de células madre del polen rodeadas de posibles células tapetales.

20 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La invención proporciona una secuencia de nucleótidos reguladora de la expresión específica en antera de un gen, en adelante secuencia de nucleótidos de la invención, seleccionada entre:

- 25 a) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 1;
- b) un fragmento de dicha SEQ ID NO 1 que mantiene la capacidad reguladora de la expresión específica en antera; y
- c) una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente análoga a la secuencia de 30 nucleótidos definida en a) o en b).

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “análoga” pretende incluir a cualquier secuencia de nucleótidos que posee, al menos, la capacidad reguladora de la expresión específica en antera. Típicamente la secuencia de DNA análoga:

- 5 - se puede aislar de cualquier organismo productor de dicha secuencia análoga en base a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 1, o
- se construye en base a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 1 mediante la sustitución de uno o más nucleótidos, la inserción de uno o más nucleótidos en la secuencia, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera
- 10 de los extremos de la secuencia, o la delección de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia. Por ejemplo, la secuencia de DNA análoga puede ser una sub-secuencia de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 1.

En general, la secuencia de DNA análoga es sustancialmente homóloga a la

15 secuencia de nucleótidos identificada como la SEQ ID NO 1. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “sustancialmente homóloga” significa que las secuencias de nucleótidos en cuestión tienen un grado de identidad, a nivel de nucleótidos, de, al menos, un 60%, preferentemente de, al menos un 85%, o más preferentemente de, al menos, un 95%.

20 La secuencia de nucleótidos de la invención puede proceder de cualquier organismo que la contiene, por ejemplo, de guisante (*Pisum sativum* L.) o bien de un organismo hospedador transformado con dicha secuencia de DNA. La secuencia de nucleótidos de la invención, puede ser aislada, mediante técnicas convencionales, a partir del DNA de cualquier otra especie mediante el empleo de sondas o de oligonucleótidos preparadas a

25 partir de la información sobre la secuencia de nucleótidos de la invención.

En una realización particular, la secuencia de nucleótidos de la invención es la secuencia mostrada en la SEQ ID NO 1, que corresponde a la secuencia de nucleótidos del promotor del gen *END1* de guisante (*Pisum sativum* L.).

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, aislamos y caracterizamos un

30 gen de guisante (*Pisum sativum* L.) que se expresaba exclusivamente en determinados

tejidos de las anteras. Su aislamiento y caracterización se realizó mediante la purificación e identificación previa de la proteína que codifica. Para ello, se comenzó realizando un proceso de inmunosustracción de extractos de estambres con un suero policlonal obtenido por inmunización de un conejo con extractos de los demás órganos florales (sépalos, pétalos y carpelos). El resultado de este proceso fue la obtención de un extracto enriquecido con proteínas específicas de los estambres, eliminándose aquellas que estos órganos poseen en común con el resto de los órganos florales. Dicho extracto enriquecido se utilizó para inmunizar ratones y obtener líneas de hibridomas que producían anticuerpos monoclonales específicos para una determinada proteína estaminal. Uno de ellos (MAbA1) reconocía una proteína de 26 kDa (END1) bastante abundante en los extractos de estambres y cuya inmunolocalización nos indicó que se acumulaba exclusivamente en los tejidos que conforman la arquitectura de los sacos polínicos de la antera. Mediante cromatografía de afinidad purificamos una cierta cantidad de dicha proteína, microsecuenciamos 20 aas de su extremo N-terminal y la secuencia obtenida mostró una elevada homología con otra proteína (PA2) previamente descrita en cotiledones de guisante y cuya función es desconocida [Higgins *et al.*, Plant Mol Biol. 8: 37-45, 1987]. La utilización del cDNA de PA2 como sonda en el escrutinio de una genoteca de flores de guisante nos permitió el aislamiento de un clon con la secuencia codificante completa (910 pb, y que denominamos END1, SEQ ID NO 2), la cual presenta un 72% de homología con la de PA2. Los ensayos de Northern mostraron la especificidad de la expresión de esta nueva proteína ya que se restringía a extractos de anteras, no detectándose en otros órganos florales, cotiledones y tejidos vegetativos. Por otra parte, los ensayos de hibridación *in situ* corroboraron la especificidad de la expresión del gen *END1* en los tejidos de la antera del guisante durante los diferentes estadios de su desarrollo (**Figura 1**). Su expresión comenzaba en estadios muy tempranos del desarrollo (diferenciación de primordios comunes en pétalos y estambres) y continuaba hasta la dehiscencia de la antera, expresándose exclusivamente en la epidermis, tejido conectivo, capa intermedia y endotecio. No se detectó expresión del gen ni en el tejido nutritivo (*tapetum*) ni en el germinal (polen). Los ensayos realizados con otros órganos florales, otras partes de la planta (tallo, hojas, raíces, etc.) o con semillas (cotiledones) resultaron negativos.

La expresión específica del gen *ENDI* en aquellos tejidos que conforman los sacos polínicos de las anteras, nos sugirió el aislamiento y análisis del promotor de dicho gen. El estudio de este promotor resultaba interesante por diversos motivos. En primer lugar, podríamos determinar qué motivos de un promotor determinan la expresión específica de un gen en anteras. Asimismo, sería interesante analizar qué factores transcripcionales regulan la expresión del gen *ENDI* y determinar si éstos están relacionados con los genes homeóticos MADS-box que regulan la identidad de los órganos florales, en particular con los genes de clase B y C que están implicados en el desarrollo de estambres. Con estos objetivos rastreamos una genoteca genómica de DNA de guisante, utilizando como sonda el fragmento completo de cDNA de *ENDI* (SEQ ID NO 2). Se realizó un primer escrutinio con 500.000 calvas fágicas en el que encontramos un clon positivo (clon 162). Éste fue purificado y aislado tras tres escrutinios más. Mediante el cultivo y lisis del fago positivo purificamos su DNA. Este DNA fue digerido con *HindII* ya que este enzima cortaba el fragmento de cDNA a 210 pb de su inicio y podríamos obtener de la digestión fágica un fragmento de DNA que contuviese las primeras 210 pb del cDNA más secuencias promotoras corriente arriba de éstas. Con el DNA digerido se realizó un análisis Southern utilizando como sonda para hibridar las 210 pb del extremo 5' del fragmento de cDNA del clon 162. Este fragmento fue empleado como sonda para determinar qué fragmento resultante de la restricción sería el constituido por estas 210 pb y parte o toda la secuencia promotora. El análisis Southern mostró que un fragmento de aproximadamente 3 Kb derivado de la digestión del DNA fágico con *HindII* hibridaba con la sonda. El fragmento de 3 Kb fue purificado mediante el método de QUIAEXII, clonado en el vector Bluescript-KS(-) en el sitio *HindII* del sitio de clonación y posteriormente secuenciado. La secuencia nucleotídica completa del promotor de *ENDI* se encuentra representada en la **Figura 2** y en la SEQ ID NO 1 (los nucleótidos de - 2736 y 1 de la Figura 2 se correlacionan con los nucleótidos 1 y 2766 de la SEQ ID NO 1, respectivamente).

Tras la secuenciación del fragmento clonado comprobamos que habíamos aislado un fragmento de 2946 pb. De éstas, las 210 pb del extremo 3' correspondían a las primeras 210 pb del fragmento del clon de cDNA 162. En las posiciones -263 (SEQ ID NO 1, 2474) y -56 (SEQ ID NO 1, 2681), tomando como nucleótido +1 el primero del cDNA 162 aislado

(en la SEQ ID NO 1 el nucleótido +1 corresponde al nucleótido 2377) se encuentran dos posibles cajas TATA, en posiciones -347 (SEQ ID NO 1, 2390) y -66 (SEQ ID NO 1, 2671) dos putativas cajas CCAAT, y en posición -401 una caja CAAT (SEQ ID NO 1, 2336) (**Figura 2**). Además de estas cajas, comunes en promotores de eucariotas, también se han encontrado cajas típicas de promotores de plantas. En la **Tabla I** están definidos todos los motivos de promotores de plantas encontrados entre el nucleótido -400 (SEQ ID NO 1, 1977) y +1 de la región promotora de *END1* utilizando la base de datos del Instituto Nacional de Recursos Agrobiológicos de Japón. Seleccionamos esta área basándonos en que las distancias en que se encuentran las cajas funcionales en los promotores con respecto al inicio de transcripción no superan normalmente los 400 nucleótidos según las referencias bibliográficas de las diferentes cajas estudiadas.

Tabla I. Descripción de los elementos *cis* localizados en el fragmento comprendido entre los nucleótidos -400 y -1 de la región promotora de *endl*.

| MOTIVO | POSICIÓN (CADENA) | SECUENCIA CONSENSO | REFERENCIA |
|-------------------------|------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| ELEMENTO 300 | - -157 (+) | TGHAAARK | Thomas y Flavell, 1990 |
| AP3 | -209 (+) | TGTGGWWW | Mercurio y Karin, 1989 |
| ASF1 | -122 (-) | TGACG | Terzaghi y Cashmore, 1995 |
| G-BOX | -84 (+) | CACGTG | Foster <i>et al.</i> , 1994 |
| E-BOX | -333, -295, -30 (+) | CANNTG | Kawagoe <i>et al.</i> , 1994 |
| GATA | -265, -205 (+) | GATA | Gilmartin <i>et al.</i> , 1990 |
| GT1 | -278, -156 (+) | GRWAAW | Lawton <i>et al.</i> , 1991 |
| HEXMOTIF1 | -127 (+) | ACGTCA | Mikami <i>et al.</i> , 1989 |
| I-BOX | -356 (-), -194 (-) | GATAA | Giuliano <i>et al.</i> , 1988 |
| MYB-PH3 | -234 (+) | CNGTTA | Solano <i>et al.</i> , 1995 |
| MYB-ST1 | -206 (+) | GGATA | Baranowskij <i>et al.</i> , 1994 |
| ROOTMOTIF1 | -202(+), -96 (+) | ATATT | Elmayan y Tepfer, 1995 |
| RY | -34 (+) | CATGCAY | Fujiwara y Beachy, 1994 |
| SIF | -215 (+) | ATGGTA | Zhou <i>et al.</i> , 1992 |
| SEF1 | -392 (+) | ATATTTAWW | Lessard <i>et al.</i> , 1991 |
| SEF4 | -276 (+) | RTTTTTR | Lessard <i>et al.</i> , 1991 |
| MYB-P | -349 (+) | CCAACC | Grotewold <i>et al.</i> , 1994 |
| SBF1 | -150 (+) | TTAA | Lawton <i>et al.</i> , 1991 |
| CarG | -103 (-) | CC(A/T) ₆ GG | Shiraishi <i>et al.</i> , 1993 |

Por otra parte, analizando visualmente la secuencia de la región promotora hemos detectado la presencia de otros motivos reguladores. Dos de ellos son cajas CARG (

5 ³²⁹TGAAAATACC⁻³²⁰ (SEQ ID NO 1 ²⁴⁰⁸TGAAAATACC²⁴¹⁷) y ⁻³⁰⁰GGTTTCAACT⁻²⁹¹

(SEQ ID NO 1²⁴³⁷GGTTTCAACT²⁴⁴⁶)), que aunque no tan semejantes como la primera a la secuencia consenso, también podrían actuar como tales. Un ejemplo de cajas CArG que son funcionales aunque difieren de la secuencia consenso lo representan dos de las tres cajas CArG (CCTTTCATGG y CCATTTTATAG) del promotor del gen *AP3* de *Arabidopsis* (Tilly JJ *et al.*, Development 125: 1647-1657, 1998). Otros motivos que hemos identificados son: el motivo ⁻²⁹⁰GTCAAAA⁻²⁸⁴ (SEQ ID NO 1²⁴⁴⁷GTCAAAA²⁴⁵³) presente en los genes *Zm13* y *LAT52* (Zou JT *et al.*, Am. J. Bot. 81: 552-561, 1994), el motivo ⁻¹²⁷ACGTCA⁻¹²² (SEQ ID NO 1²⁶¹⁰ACGTCA²⁶¹⁵) localizado en el gen *Bp19* (Zou JT *et al.*, Am. J. Bot. 81: 552-561, 1994] y el elemento C(A)_{6/8} repetido tres veces (en posiciones -507 (SEQ ID NO 2230-2236), -288 (SEQ ID NO 2449-2457) y -247 (SEQ ID NO 2490-2496)) como en los promotores de los genes *OlnB4* y *OlnB19* [Hong HP *et al.*, Plant Mol. Biol. 34: 549-555, 1997].

Los diferentes motivos encontrados en la región promotora de *END1* pueden agruparse en función del tipo de genes donde han sido descritos. Los motivos SEF1, SEF4, E-box, RY y Elemento -300 se caracterizan por estar presentes en promotores de genes que codifican proteínas de reserva de la semilla. Los motivos GATA, GT1, I-box y ASF-1 están presentes en genes cuya expresión está regulada por luz. Las cajas que reconocen los factores homólogos a proteínas Myb de animales: MYB-P, MYB-PH3 y MYB-ST1 han sido encontradas en genes implicados en la ruta de biosíntesis de fenilpropanoides. El motivo G-box está localizado en multitud de genes vegetales regulados por diversos factores ambientales y fisiológicos. SBF1 ha sido descrito en el gen de defensa *chs15* de *Phaseolus vulgaris*. Rootmotif1 ha sido identificado en la secuencia promotora de dos genes de raíz de maíz *rolD* y *pox1*. Y los elementos GTCAAAA, ACGTCA y C(A)_{6/8} están presentes en genes específicos de anteras de *Brassica napus*, como el *Bp19* [Zou JT *et al.*, Am. J. Bot. 81: 552-561, 1994; Hong HP *et al.*, Plant Mol. Biol. 34: 549-555, 1997]. Todos estos motivos están señalados en la SEQ ID NO 1.

Finalmente, el motivo CArG es una secuencia consenso de DNA que es reconocida por el dominio MADS (referencia de las siglas) que caracteriza a los genes homeóticos de plantas implicados en el desarrollo de los órganos florales [Huang H *et al.*, Nuc. Acids Res.

21: 4769-4776, 1993; Shiraisi H *et al.*, Plant J. 4: 385-398, 1993]. Los genes *APETALA-1* [*API*; Mandel MA *et al.*, Nature 360: 273-277, 1992), *APETALA-3* [*AP3*, Jack T *et al.*, Cell 68: 683-697, 1992), *PISTILLATA* [*PI*, Goto K *et al.*, Genes Dev. 8: 1548-1560, 1994) y *AGAMOUS* (*AG*, Yanofsky MF *et al.*, Nature 346: 35-39, 1990] son genes homeóticos que regulan la identidad de los órganos florales en *Arabidopsis*. Estos genes pertenecen a la familia de proteínas que contiene un dominio MADS en su secuencia. El dominio MADS lo componen 56 aminoácidos y está implicado en la dimerización de los genes MADS consigo mismos o con otros genes MADS y la posterior unión a DNA de estos dímeros [Shore P y Sharrocks AD, E. J. Biochem. 229: 1-13, 1995].

10 Los genes homeóticos de tipo B (*AP3* y *PI* en *A. thaliana*) controlan el desarrollo de pétalos y estambres, y los de tipo C (*AG* en *A. thaliana*) controlan la formación de estambres y carpelos. El gen *END1* se expresa en estambres y por tanto, podría ser un gen diana de los genes MADS de tipo B y C. Esta hipótesis es apoyada por la existencia de estas putativas cajas CArG en la región promotora de *END1*. Huang *et al.* [Nuc. Acids Res. 21: 4769-4776, 1993] y Shiraisi *et al.* [Plant J. 4: 385-398, 1993] determinaron que el gen *AG* requería de unas secuencias consenso flanqueantes a la caja CArG para su unión a DNA. La secuencia consenso de unión a DNA para el dominio MADS de *AG* fue identificada como: 5'-TT(A/T/G)CC(A/T)₆GG(A/T/C)AA-3' según Shiraisi *et al.* [Plant J. 4: 385-398, 1993] y TT(A/T)CC(A/T)(A/t)₂(T/A)NNGG(-G)(A/t)₂ según Huang *et al.* [Nuc. Acids Res. 21: 4769-4776, 1993]. Las secuencias que flanquean la caja CArG en posición -103 en el promotor de *END1*, a excepción de dos nucleótidos, cuadran con las que reconoce el dominio MADS del gen *AGAMOUS* elucidadas por los autores anteriores (Figura 3). Dato que confirmaría la hipótesis de que *END1* podría ser una diana directa de un gen homeótico floral, en concreto podría serlo del gen *AGAMOUS*.

25 Con el fin de comprobar si la secuencia promotora clonada de *END1* dirigía la expresión específica de un gen en anteras y si era capaz de hacerlo en plantas distintas al guisante (*P. sativum*), transformamos plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), *Arabidopsis thaliana* y tomate (*Lycopersicon esculentum*) con la secuencia promotora fusionada a la secuencia codificante del gen de la β-glucuronidasa (*uidA*, GUS-intrón) [Ejemplo 1]. Se

realizaron dos construcciones distintas utilizando el plásmido pBII101: pBII101-F3 y pBII101-F1.5 (Figura 4). La primera construcción contiene la secuencia de nucleótidos comprendida desde el nucleótido -2736 al -6 (SEQ ID NO 1, 1 al 2731) y la segunda contiene la secuencia desde el residuo -1531 al -6 (SEQ ID NO 1, 1206 al 2731). Esta última construcción fue ensayada para delimitar, en un primer intento, la secuencia que constituye la región promotora en el fragmento clonado. Ambas construcciones fueron introducidas en *Arabidopsis* empleando la cepa C58 de *Agrobacterium tumefaciens*, y la construcción pBII101-F3 en tabaco y en tomate mediante la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens*. Todas estas plantas fueron transformadas a su vez con el plásmido pBII101 como control y analizadas posteriormente la expresión del gen reportero en los distintos tejidos.

Los resultados de las transformaciones descritos en los ejemplos posteriores demuestran que la secuencia promotora aislada del gen *END1* es totalmente funcional ya que dirige la expresión heteróloga de un gen de manera específica en anteras de plantas distintas al guisante. Además, se ha circunscrito esta capacidad a la secuencia de nucleótidos comprendida entre la posición -1531 y -6 del promotor (SEQ ID NO 4). Por otro lado, se puede definir con experimentos similares la secuencia de nucleótidos mínima que mantendría sustancialmente esta capacidad reguladora de la expresión específica de antera. Así, forman parte de la presente invención todas estas secuencias de nucleótidos, ya sea la región completa del promotor *END1* o cualquier fragmento de la misma que mantengan sustancialmente esta capacidad de dirigir la expresión específica de antera. Por otro lado, a partir de esta secuencia del promotor del gen *END1* del guisante pueden obtenerse la región promotora de los genes homólogos del *END1* en otras especies vegetales merced al conocimiento general existente de las técnicas de biología molecular. Todas estas secuencias de nucleótidos homólogas a la descrita en la presente invención y que mantengan sustancialmente la capacidad de regular la expresión específica de antera forman parte de la presente invención.

Estas secuencias reguladoras pueden utilizarse en el desarrollo de construcciones de DNA que incluyan además secuencias codificantes de genes de interés que a su vez pueden integrarse en vectores recombinantes de expresión. Para ello se pueden utilizar distintas

técnicas ampliamente conocidas en el estado de la técnica [Sambrook et al, "Molecular cloning, a Laboratory Manual", 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989 Vol 1-3] algunas de los cuales se muestran en la presente invención. Estos vectores recombinantes permiten la expresión de distintos genes codificantes de péptidos, polipéptidos, proteínas o RNA que, como se describe en el estado de la técnica de la presente invención, al ser tóxicos para los tejidos donde se expresen inducirían la ablación de los mismos y en este caso producirían la androesterilidad de la planta resultante. Ejemplos de estos genes son los descritos en la solicitud de patente europea EP 412006 y que pueden tomarse como referencia junto con los que se describen en el estado de la técnica de la presente invención. Por otro lado, estas construcciones pueden contener otros elementos reguladores de la expresión específica de antera dependiendo del vector recombinante utilizado, la planta a transformar, etc. Todas estas posibles construcciones de DNA conteniendo como denominador común la secuencia de nucleótidos de la invención así como el uso de las mismas para la transformación de plantas androestériles forman parte de la presente invención.

Por tanto, la invención proporciona una construcción de DNA que comprende la secuencia de nucleótidos de la invención y una secuencia de nucleótidos codificante de un péptido, polipéptido, proteína, actividad o RNA de interés. En una realización particular, dicha construcción de DNA comprende una secuencia codificante de una actividad promotora de la esterilidad en plantas bajo el control de la secuencia de nucleótidos de la invención. En otra realización particular, dicha construcción de DNA comprende una secuencia codificante de una actividad que revierte o recupera la fertilidad de las plantas, tal como una secuencia codificante de una actividad capaz de inhibir la actividad promotora de a esterilidad en plantas, bajo el control de la secuencia de nucleótidos de la invención. Dicha construcción de DNA también puede contener, operativamente enlazados, unos elementos reguladores de la expresión específica de antera, por ejemplo, una secuencia de terminación de la transcripción, dependiendo del vector recombinante utilizado, la planta a transformar, etc.

La secuencia de nucleótidos de la invención, o la construcción de DNA proporcionada por esta invención, puede ser insertada en un vector apropiado. Por tanto, la

invención también se refiere a un vector, tal como un vector de expresión, que comprende dicha secuencia de nucleótidos de la invención, o dicha construcción de DNA. La elección del vector dependerá de la célula hospedadora en la que se va a introducir posteriormente. A modo de ejemplo, el vector donde se introduce dicha secuencia de ADN puede ser un plásmido o un vector que, cuando se introduce en una célula hospedadora, se integra en el genoma de dicha célula y se replica junto con el cromosoma (o cromosomas) en el que (o en los que) se ha integrado. La obtención de dicho vector puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia [Sambrook et al., 1989, citado *supra*].

10 La invención también proporciona una célula que comprende una secuencia de nucleótidos de la invención, o una construcción de DNA que contiene a dicha secuencia de nucleótidos o dicho vector mencionado más arriba. Las células hospedadoras que se pueden transformar con la secuencia de nucleótidos de la invención pueden ser células procarióticas o, preferentemente, eucarióticas, tales como células de tejidos vegetales. La transformación de células de tejidos vegetales también puede realizarse por métodos convencionales. Para una revisión de la transferencia génica a plantas, incluyendo vectores, métodos de transferencia de ADN, etc., véase, por ejemplo, el libro titulado “Ingeniería genética y transferencia génica”, de Marta Izquierdo, Ed. Pirámide (1999), en particular, el capítulo 9, titulado “Transferencia génica a plantas”, páginas 283-316.

20 La secuencia de nucleótidos de la invención puede ser utilizada para transformar plantas y obtener plantas transformadas. La transformación de plantas está ampliamente descrita en el estado de la técnica. Como es bien conocido, pueden utilizarse múltiples sistemas, por ejemplo, vectores plasmídicos, liposomas, electroporación, microinyección, difusión, bombardeo de partículas (gene gun), coprecipitación con fosfato de calcio, empleo de vectores virales, etc. En la presente invención se describe la transformación de plantas mediante un vector plasmídico como un ejemplo de las múltiples posibilidades técnicas, todas las cuales forman parte de la presente invención. En este sentido, en el Ejemplo 1, se describe la transformación de plantas de tabaco (*N. tabacum*), tomate (*L. sculentum*) y *Arabidopsis thaliana* como ejemplos de transformación de plantas.

La secuencia de nucleótidos de la invención puede utilizarse para regular la expresión específica de antera de una secuencia codificante de un péptido, polipéptido, proteína, actividad o RNA de interés en una planta. En una realización particular, la secuencia de nucleótidos de la invención puede ser utilizada para producir plantas con esterilidad masculina (androesterilidad), es decir, plantas androestériles, que comprende 5 transformar una planta con una construcción de DNA proporcionada por esta invención, comprendiendo dicha construcción de DNA una secuencia codificante de una actividad promotora de la esterilidad en plantas, por ejemplo, la secuencia de un gen citotóxico, tal como un gen que codifica una actividad ribonucleasa, bajo el control de la secuencia de 10 nucleótidos de la invención, de manera que la expresión de la secuencia codificante contenida en dicha construcción provoca la ablación completa de las anteras desde estadios muy tempranos de su desarrollo, impidiendo la formación del polen en las mismas y produciendo androesterilidad de la planta con un 100% de eficacia. La planta androestéril resultante puede ser utilizada para la producción de semillas híbridas mediante un método 15 que comprende su cultivo bajo condiciones que permiten su desarrollo y maduración.

Asimismo, la invención proporciona un método para restaurar la fertilidad de una planta androestéril que comprende transformar dicha planta androestéril con una construcción de DNA que comprende una secuencia codificante de una actividad que revierte o restaura la fertilidad bajo el control de la secuencia de nucleótidos de la invención 20 de manera que se obtiene una planta fértil. En una realización particular, la androesterilidad es debida a la expresión del gen *barnasa* y la recuperación de la fertilidad es debida a la expresión de una secuencia codificante de una actividad que revierte o restaura la fertilidad tal como la expresión de *barstar*, una actividad capaz de inhibir la actividad de ablación de las anteras causada por BARNASA.

25 Las plantas susceptibles de ser transformadas mediante el empleo de la secuencia de nucleótidos de la invención pueden ser tanto plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas, por ejemplo, plantas monocotiledóneas o dicotiledóneas de interés agronómico, tales como, cereales y plantas hortícolas, e.g., tabaco, tomate, melón, sandía, pepino, etc.

En otra realización particular, la invención proporciona una célula transgénica que comprende una secuencia de nucleótidos de la invención integrada en su genoma, así como una planta transgénica que comprende, al menos, una de dichas células transgénicas. Dichas plantas transgénicas, que constituyen un objeto adicional de la invención, se pueden obtener mediante el empleo de técnicas convencionales, por ejemplo, mediante el empleo de técnicas convencionales de mRNA antisentido y/o sobreexpresión (silenciamiento en sentido), u otras, por ejemplo, utilizando vectores binarios u otros vectores disponibles para las diferentes técnicas de transformación de plantas existentes en la actualidad. Ejemplos de plantas transgénicas que forman parte de la presente invención incluyen tanto plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas.

La secuencia de nucleótidos de la invención es útil para obtener plantas androestériles y producir semillas híbridas al dirigir la expresión de genes que codifican para determinados enzimas que producen ablación celular en aquellos tejidos que conforman los sacos polínicos, tal y como se explicó anteriormente. Este sistema, en combinación con otro similar que restaure la fertilidad al producir un inhibidor del enzima utilizado para provocar la ablación celular, sería de gran utilidad en programas de mejora genética basados en la producción de híbridos (heterosis). Con idéntica finalidad se han probado con anterioridad diversos promotores, pero no con todos ellos se ha conseguido una población de plantas estériles al 100% [Zhan X *et al.*, Sex. Plant Reprod.9: 35-43, 1996; Roberts MR *et al.*, Sex. Plant Reprod. 8: 299-307, 1995]. Este fenómeno es debido a que estos promotores se activan en etapas tardías del desarrollo donde el polen está ya parcialmente desarrollado, de manera que el tejido que sufre la ablación (*tapetum*) ya no es estrictamente imprescindible para la completa maduración del polen. Esta metodología presenta un grave problema porque como resultado final se obtiene una población mixta de semillas híbridas y no híbridas. La secuencia de nucleótidos de la invención constituye una alternativa a dichos promotores porque es activada cuando se inicia la diferenciación de los primordios estaminales. En esta fase temprana, una proteinasa o una nucleasa impediría el desarrollo correcto de la antera al destruir en una etapa muy temprana las líneas celulares que darán lugar a los tejidos que conforman los sacos polínicos. Los tejidos donde se expresa *ENDI* son tejidos que proporcionan el soporte y la estructura (arquitectura) a la

antera por lo que es difícil imaginar una antera capaz de producir polen sin estos tejidos. En este sentido, el Ejemplo 2 describe la obtención de plantas androestériles de *A. thaliana* con una eficacia del 100%. Es de esperar, razonablemente, que la secuencia de nucleótidos de la invención, en particular, el promotor *END1*, será capaz de mantener su especificidad en diferentes plantas tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas ya que en varias de estas plantas se han identificado genes *MADS* de clase C (homólogos de *AGAMOUS*) que podrían activar dicho promotor al igual que en las dicotiledóneas, por lo que cabe esperar que dicha secuencia de nucleótidos de la invención sea útil para producir androesterilidad tanto en plantas dicotiledóneas como en monocotiledóneas de interés agronómico.

10

EJEMPLO 1

Estudios de funcionalidad del promotor *END1* en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, tabaco (*Nicotiana tabacum*) y tomate (*Lycopersicon esculentum*)

1.1-Diseño de las construcciones pBI101-F3 y pBI101-F1.5

15 La región promotora del gen *END1* se amplificó mediante la técnica de PCR a partir del fragmento genómico de DNA clonado en el plásmido pBluescript KS(+), utilizando los oligos TB1, TB2 y TB3 (Tabla 2). TB1 introduce un sitio de restricción *Bam*HI, y TB2 y TB3 introducen un sitio de restricción *Sal*I. Se amplificaron dos fragmentos: uno de 2731 pb que contiene casi toda la región promotora aislada (-2736/-6) y otro de 1526 pb próximo a la zona codificante del gen (-1531/-6 en la Figura 1) (SEQ ID NO 4). Ninguno de estos dos fragmentos contenía secuencia codificante. Ambos fragmentos se clonaron en el vector plasmídico PCR_{2,1}. [Clar, J.M. (1998) *Nuc.Acids.Res.* 16:9677-9686; Mead, D., et al. (1991) *Bio Technology* 9:657-663]. Posteriormente, los insertos clonados se liberaron con los enzimas de restricción *Bam*HI y *Sal*I, y se clonaron en el plásmido pBI101 dirigiendo la expresión del gen *uidA* (GUS-intrón) de la β -glucuronidasa (Vancanneyt G *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 220:245-250, 1990). Al final del proceso se lograron dos construcciones distintas: pBI101-F3 y pBI101-F1.5. La primera contenía el fragmento de 2731 pb y la segunda el fragmento de 1526 pb (Figura 4).

25

| Cebadores | Secuencia (5'→3') | DNA molde |
|-----------|--------------------------------------|-----------|
| TB1 | GAGAGCCTAGGAAGGTTATGTTGTGAGC | clon F3 |
| TB2 | GACTCGAGGTCGACTTCAACCTTATTAGT G | clon F3 |
| TB3 | GACTCGAGGTCGACAACCAGTGTGCATAT ATC | clon F3 |

Tabla 2. Cebadores empleados en las amplificaciones por PCR.

1.2.- Transformación de *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum* y *Lycopersicon esculentum*

Para la obtención de plantas transgénicas de tabaco se utilizaron las variedades de *N. tabacum* cvs. Samsun y Pettit Habane SRI. La transformación se realizó con discos de hojas en cocultivo con *A. tumefaciens* (cepa LBA4404) durante tres días a 24°C en oscuridad en medio MSS (medio Murashige y Skoog 4.4 g/l, sacarosa 2%, Mes 100 mg/l, phytigel 3.5 g/l, pH 5.9) siguiendo el método descrito por Horsch *et al.* (Science, 223: 496-498, 1984) con modificaciones de Fisher y Guiltinan (Plant Mol. Biol. Reporter 13: 278-289, 1995). Tras la incubación, los discos foliares fueron transferidos a placas con medio de regeneración y selección (medio MSS con IAA 0.2 mg/l, 6-BAP 2.2 mg/l, carbenicilina 400 mg/l y kanamicina 100 mg/l), y los brotes que iban apareciendo eran transferidos a medio de enraizamiento (medio MSS con IAA 0.2 mg/l, carbenicilina 200 mg/l y kanamicina 100 mg/l). Las plantas regeneradas se pasaban a macetas con turba:vermiculita (1:1) donde se mantenían hasta que producían semillas. Las condiciones de cultivo durante todo el proceso fueron de 12 h de fotoperiodo y 24°C de temperatura.

Para la producción de plantas transgénicas de *A. thaliana* se utilizó la variedad Columbia. Se siguió el protocolo de transformación por infiltración a vacío y selección de plantas resistentes a kanamicina descrito por Bechtold *et al.* (C R Acad. Sci. Paris, Life Sci., 316: 1194-1199, 1993). La cepa de *A. tumefaciens* que se utilizó fue la C58. Las plantas resistentes a kanamicina se pasaron a macetas con vermiculita: perlita: turba (1:1:1)

y crecidas en cámara de cultivo a 22°C en condiciones de día largo hasta que finalmente se recogieron las semillas.

Para la obtención de plantas transgénicas de tomate se utilizó la variedad de crecimiento determinado VC82b y se utilizó el método de Ellul *et al.*, (Teor. Appl. Genet. en prensa, 2001) que utiliza como material de partida cotiledones procedentes de semillas en germinación (12 días) y el gen marcador *nptII* para realizar la selección de los transformantes en un medio con kanamicina.

1.3.-Análisis histoquímico (GUS) de las plantas transgénicas

La primera generación de plantas transformadas se sometió a análisis histoquímico de la actividad del gen de la β -glucuronidasa. Los tejidos estudiados se infiltraron mediante dos pulsos de vacío de 5 min en una solución con tampón fosfato 0.1 M pH 7.0, ferricianida 0.5 mM, ferrocianida 0.5 mM, tritón X-100 al 0.1% y ácido X-GlcA 2 mM y se incubaron en ella a 37°C durante 16 h. Posteriormente, se destañaron con lavados sucesivos de etanol de 50°, 70° y 96°. Se identificaron como zonas GUS positivas aquellas coloreadas de azul. Los tejidos que presentaron coloración azul se fijaron e incluyeron en parafina (Cañas LA *et al.*, Plant J. 6: 597-604, 1994) antes de ser deshidratados para identificar sobre secciones qué tipos celulares en concreto eran responsables de la actividad β -glucuronidasa. Las fotografías de los tejidos sin procesar se realizaron con una lupa MZ8 (Leica) y las de las secciones de tejidos incluidos en parafina en un microscopio óptico Eclipse 600 (Nikon).

1.4.- Análisis de las plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*

El estudio de la expresión del gen *uidA* (GUS-intrón) se realizó mediante ensayo histoquímico de la actividad β -glucuronidasa en tejidos de la primera generación de plantas transformadas resistentes a kanamicina. Los órganos ensayados fueron: flores, hojas, tallos, raíces y plántulas germinadas de semilla.

Analizamos 26 plantas transformadas con la construcción pBI101-F3, de las cuales 24 mostraron actividad específica de β -glucuronidasa en anteras y las dos restantes no mostraron actividad en ninguno de los tejidos estudiados (Figura 5). De 19 plantas transformadas con la construcción pBI101-F1.5 y resistentes a kanamicina sólo dos

presentaron ausencia de actividad GUS. En las 17 restantes se observó coloración azul específicamente en anteras. Los tejidos de antera que presentaban actividad GUS eran los mismos en los que el gen *END1* de guisante se expresa: epidermis, conectivo, capa intermedia y endotecio. El filamento estaminal, el haz vascular central, tejido nutritivo (5 *tapetum*), las células madres del polen y el polen adulto no mostraron actividad GUS en ningún caso. Las plantas que fueron transformadas con el plásmido pBI101 (control negativo) no mostraron actividad GUS en ninguno de los tejidos analizados.

No se observaron diferencias en la actividad GUS entre plantas transformadas con una u otra construcción. Sin embargo, sí que observamos variabilidad en la intensidad de coloración entre flores de una misma planta, independientemente de la construcción utilizada, ya que podíamos distinguir flores en un determinado estadio que no mostraban actividad GUS y otras en el mismo estadio que sí la presentaban. Posiblemente este fenómeno sea debido a la diferente penetrabilidad que presentan los reactivos del ensayo frente a unos tejidos y otros. La similitud en los resultados obtenidos con ambas (10 construcciones indican que en el fragmento comprendido entre los residuos -1531 al -6 se encuentran todas las secuencias reguladoras necesarias para su actividad, si bien serán necesarios estudios posteriores para determinar el fragmento mínimo que sea capaz de mantener la actividad promotora. (15

20 1.5.-Análisis de las plantas transgénicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*)

El estudio de la expresión del gen *uidA* se realizó en la primera generación de plantas transformadas con la construcción pBI101-F3. Los tejidos que se ensayaron fueron: flores, hojas, tallos y raíces.

Analizamos 12 plantas de tabaco resistentes a kanamicina, de éstas 10 presentaron actividad GUS en sus anteras y dos no mostraron actividad en ninguno de los tejidos ensayados (Figura 6). Entre flores de una misma planta encontramos la misma variabilidad en la coloración azul que la observada en *A. thaliana*. Las plantas transformadas con el plásmido pBI101 (control negativo) no presentaron actividad β -glucuronidasa en ninguno de sus tejidos como se esperaba. (25

1.6.- Análisis de las plantas transgénicas de tomate (*Lycopersicon sculentum*)

Se analizaron 10 líneas diferentes de plantas resistentes a kanamicina, de las cuales, la mitad resultaron positivas cuando se analizó la expresión del gen *uidA* en anteras. El estudio de la expresión de dicho gen se realizó en la primera generación de plantas transformadas con la construcción pBI101-F3. Los tejidos que se ensayaron fueron: flores, hojas, tallos y raíces. Como en los casos anteriores, los resultados fueron prácticamente idénticos, observándose la expresión del gen GUS sólo en aquellos tejidos que conforman el saco polínico de la antera (Figura 7).

10

EJEMPLO 2

Obtención de plantas androestériles de *Arabidopsis thaliana* mediante la utilización del gen *barnasa* bajo el control del promotor END1

2.1.- Diseño de la construcción pBI101-pEND1-*barnasa/barstar*

La construcción pBI101-F3 que contiene el fragmento de 2731 pb del promotor END1 y el gen GUS, fue digerida con los enzimas de restricción BamHI y SacI, lo que dio lugar a la liberación del fragmento GUS. El fragmento correspondiente al plásmido pBI101-pEND1 con extremos BamHI y SacI, fue aislado de un gel de agarosa usando el sistema Quiaex II (Quiagen). El fragmento *barnasa/barstar* (Mariani *et al.*, Nature 347: 737-741, 1990; Mariani *et al.*, Nature 357: 384-387, 1992) clonado en el sitio BamHI del plásmido pBluescript KS (+), fue amplificado utilizando los oligos:

20

T7: 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3', e

Inhi II: 5' GCGAGCTCTTAAGAAAGTATGATGGTGATG 3'

25

Con el primero se mantiene el sitio de corte BamHI a nivel del ATG del gen *barnasa* y el último crea un sitio de corte para SacI a nivel del codon de parada del gen *barstar*. El fragmento producto de la reacción de PCR se ligó al vector pGEM-T (Promega). Por último, el inserto *barnasa/barstar* clonado (918 pb) se liberó con BamHI y SacI y fue ligado al plásmido pBI101-pEND1 con extremos BamHI y SacI.

30

2.2.- Resultados y comentarios

Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 8**. Las plantas transformadas con la construcción pEND1-BARNASA muestran como los carpelos de sus flores no esta fertilizadas y no se forman las correspondientes silíquas como sucede en la planta control.

5 Por otra parte las flores de las plantas transgénicas muestran los filamentos que no se han elongado y en cuyo extremo aparecen unas estructuras muy rudimentarias en lugar de las anteras. El total de las 17 plantas transgénicas resistentes a kanamicina recuperadas mostró una ablación completa de sus anteras y por tanto un 100% de esterilidad masculina.

Los estudios realizados por microscopía electrónica de barrido (SEM) mostraron
10 (**Figura 9**) que los tipos celulares presentes en dichas estructuras no se corresponden con los presentes en la epidermis de una antera, detectándose tan sólo aquéllos que conforman el filamento o los que están presentes en la zona de unión del filamento con la antera. Estos estudios se completaron con secciones de las estructuras en parafina y posterior tinción de las mismas con Azul Alcian y Safranina para detectar líneas celulares relacionadas con el desarrollo del polen. En la **Figura 10** observamos cómo en el interior de las estructuras
15 situadas al final del filamento se observan pequeños grupos de células madre del polen y quizás de *tapetum* externo (en rojo) que parecen haber detenido su desarrollo al compararlas con el proceso que normalmente se produce en una antera no transformada.

Como ya se ha explicado, el sistema *barnasa/barstar* se ha utilizado con éxito en la
20 producción de plantas con esterilidad masculina al ser dirigido a las anteras de la planta mediante el uso de promotores específicos (generalmente de *tapetum*). La principal desventaja de este sistema reside en el uso de dichos promotores, los cuales actúan demasiado tarde en el desarrollo de la antera y sobre un tejido (*tapetum*) implicado en la nutrición de las células que darán lugar al polen. Este efecto se traduce en que en algunas
25 flores de la planta, se produzca polen en una cierta proporción, propiciando escapes en el sistema que se traducen en una pérdida de eficacia (<95%).

Utilizando el promotor del gen *END1* estos problemas no existen debido a tres razones:

- La expresión de la BARNASA (RNasa) se realiza en estadios muy tempranos del
30 desarrollo de la antera, produciéndose una completa ablación de las líneas celulares

que darán lugar a los tejidos que conforman los sacos polínicos: epidermis, endotecio, conectivo, lámina media, etc.).

- Tan sólo se forma el filamento situado en la base de la antera y nunca se elonga hasta llegar al estigma del carpelo.
- 5
- Si bien las líneas celulares que darán lugar al *tapetum* externo y a las células madre del polen no sufren los efectos de la BARNASA al no ser diana del promotor END1, se detienen en una fase temprana de su desarrollo al no contar con el apoyo del resto de tejidos de la antera, los cuales también serían fundamentales para el proceso de liberación del polen maduro (dehiscencia).

REIVINDICACIONES

1. Una secuencia de nucleótidos reguladora de la expresión específica en antera de un gen seleccionada entre:

5

- a) una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 1;
- b) un fragmento cualquiera de dicha SEQ ID NO 1 que mantiene la capacidad reguladora de la expresión específica en antera; y
- 10 c) una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente análoga a la secuencia de nucleótidos definida en a) o en b).

2. Secuencia de nucleótidos reguladora según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 4.

15

3. Una construcción de DNA que comprende una secuencia de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 y una secuencia de nucleótidos codificante de un péptido, polipéptido, proteína, actividad o RNA.

20

4. Un vector recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, o una construcción de DNA según la reivindicación 3.

25

5. Una célula transformada que comprende una secuencia de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, o una construcción de DNA según la reivindicación 3, o un vector recombinante según la reivindicación 4.

30

6. Una célula transgénica que comprende, insertada en su genoma, una secuencia de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, o una construcción de DNA según la reivindicación 3, o un vector recombinante según la reivindicación 4.

7. Una planta transgénica que comprende, al menos, una célula transgénica según la reivindicación 6.

5 8. Planta transgénica según la reivindicación 7, que comprende, al menos, una célula transgénica que contiene una construcción de DNA según la reivindicación 3, en el que dicha secuencia de nucleótidos codificante codifica un péptido, polipéptido, proteína, actividad o RNA que es citotóxico y su expresión induce la ablación de la antera, y dicha secuencia codificante se encuentra bajo el control de una secuencia de nucleótidos según
10 cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.

9. Planta transgénica según la reivindicación 7, seleccionada entre monocotiledóneas y dicotiledóneas.

15 10. El uso de una planta transgénica según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 para producir semillas híbridas.

20 11. Un método para producir plantas androestériles, que comprende transformar una planta con una construcción de DNA según la reivindicación 3, comprendiendo dicha construcción de DNA una secuencia codificante de una actividad promotora de la esterilidad en plantas bajo el control de una secuencia de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, de manera que dicha la expresión de dicha secuencia codificante provoca la ablación de las anteras.

25 12. Un método para restaurar la fertilidad de una planta androestéril que comprende transformar dicha planta androestéril con una construcción de DNA según la reivindicación 3, comprendiendo dicha construcción una secuencia codificante de una actividad que revierte o restaura la fertilidad que inhibe la actividad de ablación de las anteras, bajo el control de una secuencia de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.

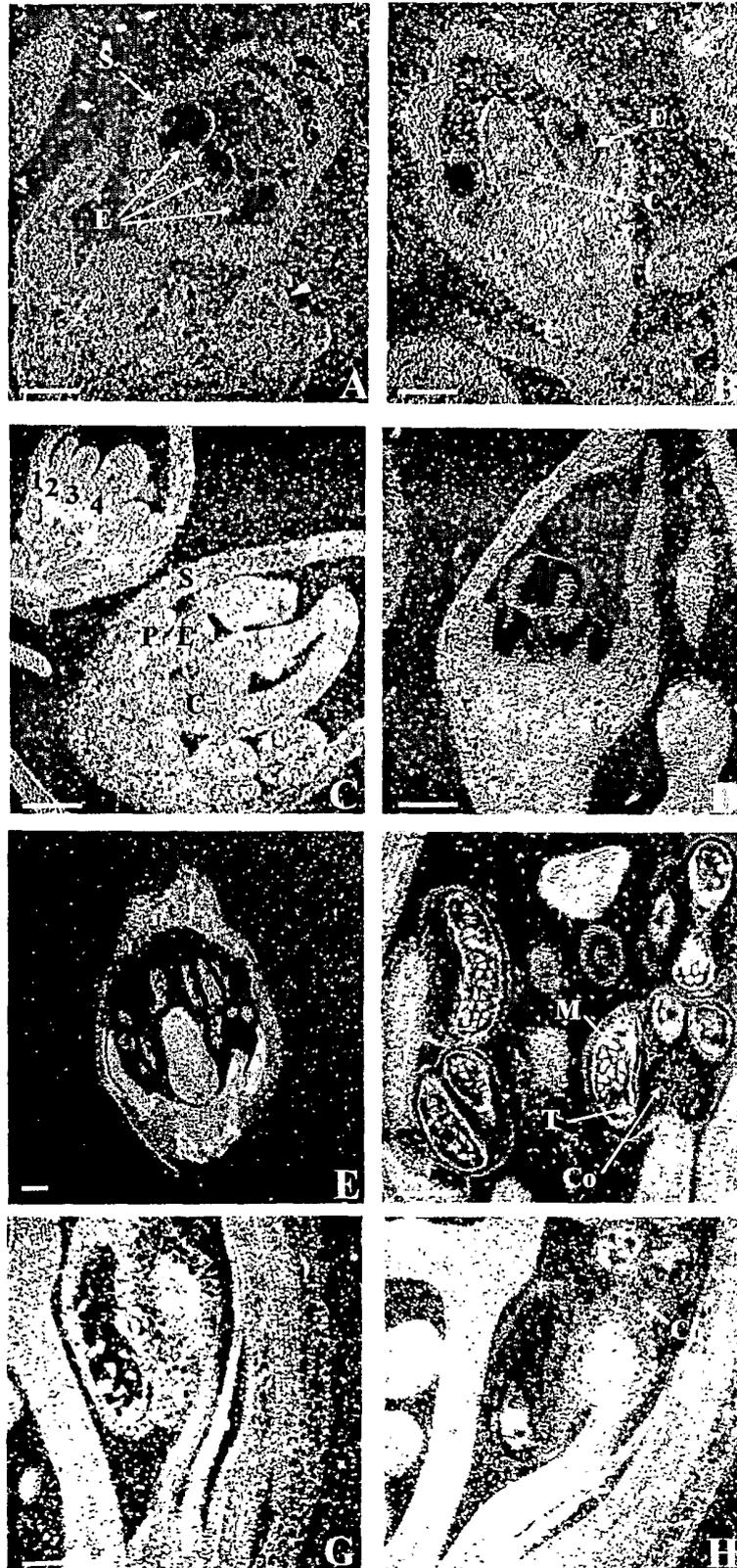


Figura 1

```

-2736 gacttcaacc ttattagtga atggacaata aaggttataa gctcctttac
-2686 tgtgaaagcc caccagtaac atcaccttgc ttatatcatt cagcttcttt
-2636 ctagtacatc ttggaacgtg tttataacag aaaaaaaccc aaaaactctg
-2586 aaaagactca cacttttctt atctccagtc cacctctcaa aaggaacaat
-2536 ttccctcagc ttcttggttg gacacctggt gagcacatat gctgcagtgg
-2486 caacagtttc tccccacaaa gtgttaggaa gcttcttctc cttcagcatg
-2436 ttccctgtca tatcaagcaa agttcgggtt tcaacaagac cattatgttg
-2386 aggagtatat ggatcagtca cttcatgctc aattccattc tctttacaga
-2336 acttcttgaa ctctgtagag ttatactcac ctccaccatc agttctgaga
-2286 atcttcagaa gtctgaccac tttattttctc agccttgatt atgaatttct
-2236 taaattcagc aaacacctcg tgtttgaatt ttataaggga taccctatgc
-2186 atccttggtg actcatccat aatgacata aagtattatt cctcctagt
-2136 gaaaggtttg taatgggcca cacacataag aatgcactac tcctaaagca
-2086 tgttttgctc tttgagctac ttttgatgaa aatggcagtc ttggttgctt
-2036 ccctttcatg cacacattac atgacttttt tggtttctta attgtaggaa
-1986 ttccacgtac cagtttcttt gaattcaaat tccctaagct cctaaagttc
-1936 aaatgaccaa atcttttggt ccacaactca ctttccttca caacacttgt
-1886 tgcgctaagg cattcagagt ctgcagtttt aacattcgcc ttgaatgttt
-1836 tactccttcc atgttctgac tccataatca acttctgata acagtcatac
-1786 agcttcaaaa gaatgtcatt catggtaact ggaaatccct tttcaattaa
-1736 ttgacctaca ctcatcagat tgccttctcat gccagaacg taccaagacc
-1686 ttctgaatta atgcagattt tctattattc ataactcctc taacttccc
-1636 cattccttta gcatttagtt acttatcctc agcacatcta atcttggttt
-1586 tcttcctaga gtcaaaatca accagccatt tcttatttcc agtatgatgg
-1536 tttgaacaac cagtgtccat atatcaccag tcttctatag acgcactatc
-1486 ataactagaa gccattaata gcacatgttc atcatggtgc tcagatcctt
-1436 agaatgttca attgctacaa cgatgtaatc aaactgatga gtaagagatc
-1386 taagtacctt ctcaatgata ctttctctat aaagagtttc tccatgagc
-1336 ttcatctcat ttgtgatcag aatcactcta gagatgtagt cagataactt
-1286 ctcatgttcc ttcatgctta gattctcata ctgctcacgt agagactgaa
-1236 gtttcacctt ctacactgat gcactactat cgtagcacca caccagtctg
-1186 tctcacacaa ccttttccgt cattgaatca acgattttct taaacacgtt
-1136 cacatccaca cactgatgga tgtagaacaa cgcattctga tccttcttc
-1086 tcatatcaca ctgagcattt ctttgcgcat cegttgcatt ttctagaagt
-1306 gaagcataaa ctctggtgat gagatcaaga acatcttgag caccaataaa
-986 cacacacatc tgaatcatcc aacgattcca gttggtgctg tcgaacaatg
-936 gnagcntggt gcacagattc acaacgatat attataantt ttgttttatg
-886 aaatttaaga acaaatttcc attattctta aaatgtttac aactgatgt
-836 agactgcaaa aggaataaag atacaatttg ttcacaccac tcaactgctg
-786 aatatataag gagagttaat gagaaatact aaaataccct ctaaaattat
-736 gaattaattc taacaatctc taatgtagt ataatccatt aaacactttg
-686 atggcaggta taacaagggg gtaagttagt gtatacatat taggctctta
-636 ttatttttat attatctctg cttttcttct tcatgttctc actaatatga
-586 tattatctcc cttccctaaa ttatttatat ttatttagaaa aagagtttca
-536 ttttttaaaa atatattacc gtaatttttc aaaaaataaa atttaaatat
-486 attttataaa aaaattattt aataatttat ttacattaat gcataaatat
-436 aaataaatac tgtcatttaa tattaacct tttaacata aattatattt
-386 atttaattca actaatataa gctaagttat ctcatccaag caattaaaaa
-336 gatcatttga aaataccttt ttatttagtt tgtggcggtt tcaactgtca
-286 aaaaaaagga atttttacga cgatataaat ttaaaccagc aaaaaattga
-236 agcagtttaag cgaaccaact catggtatgt ggatatattt atctttgtcg
-186 tttatatcgg attcgaatct ctataatgat gaaaaattaa tatcaaactt
-136 taaataagaa cgtcatttat agagccattt tgggaaacac atatttcatg
-86 tacacgtgat tcgcaaat tccaataactc tatatatagc cctcctcagt
-36 ttcatgcatt tgctcacaac ataaccttcc ttgaatTCGA TATCTACCTA
AGATGACAAA ACCAGG +1

```

Figura 2

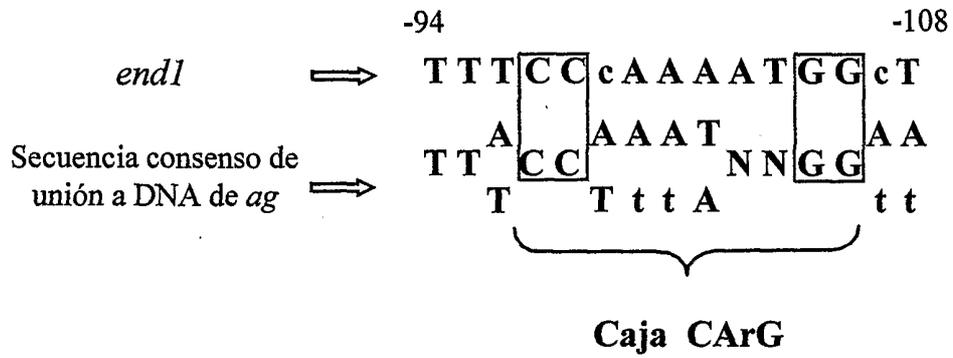


Figura 3

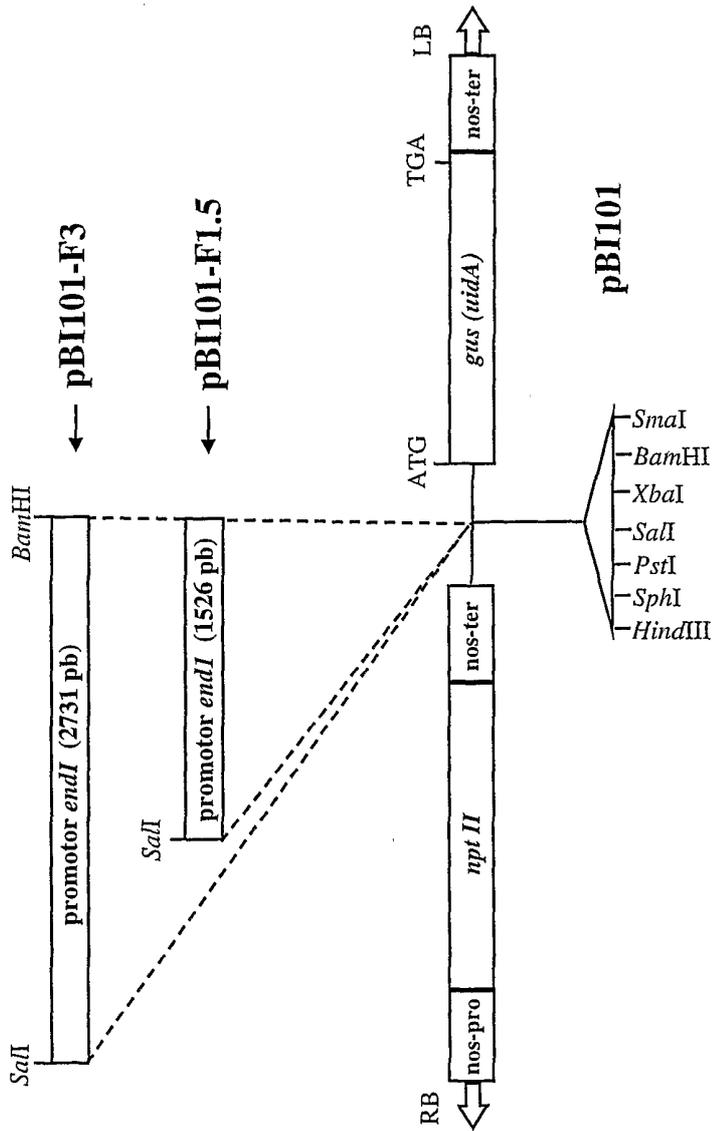


Figura 4

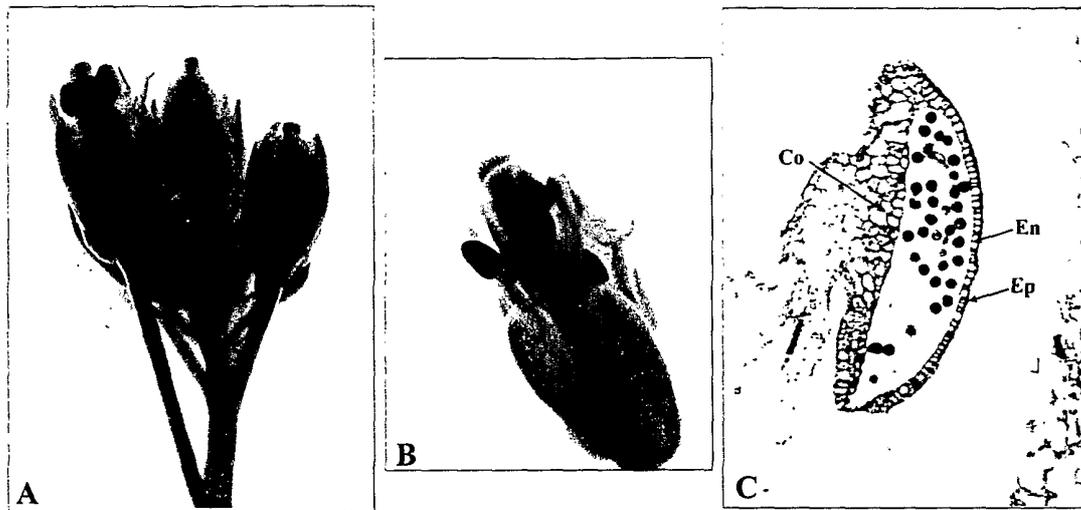


Figura 5

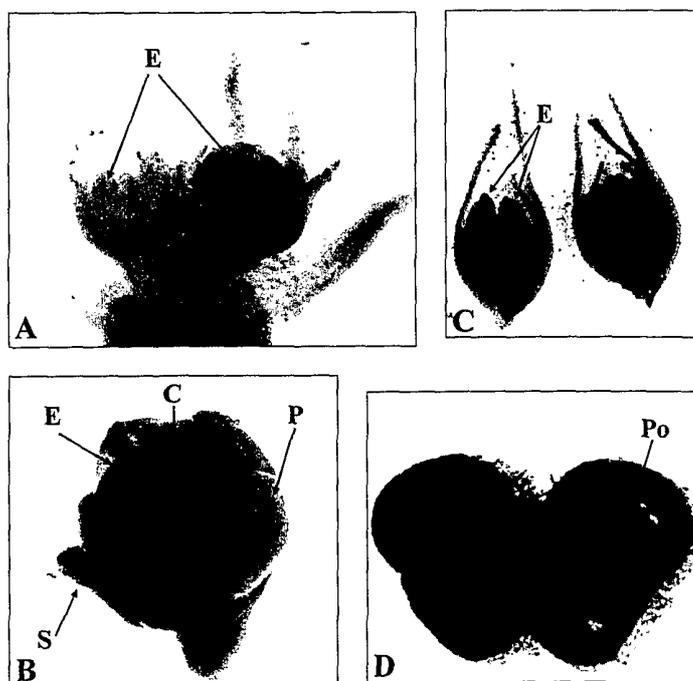


Figura 6

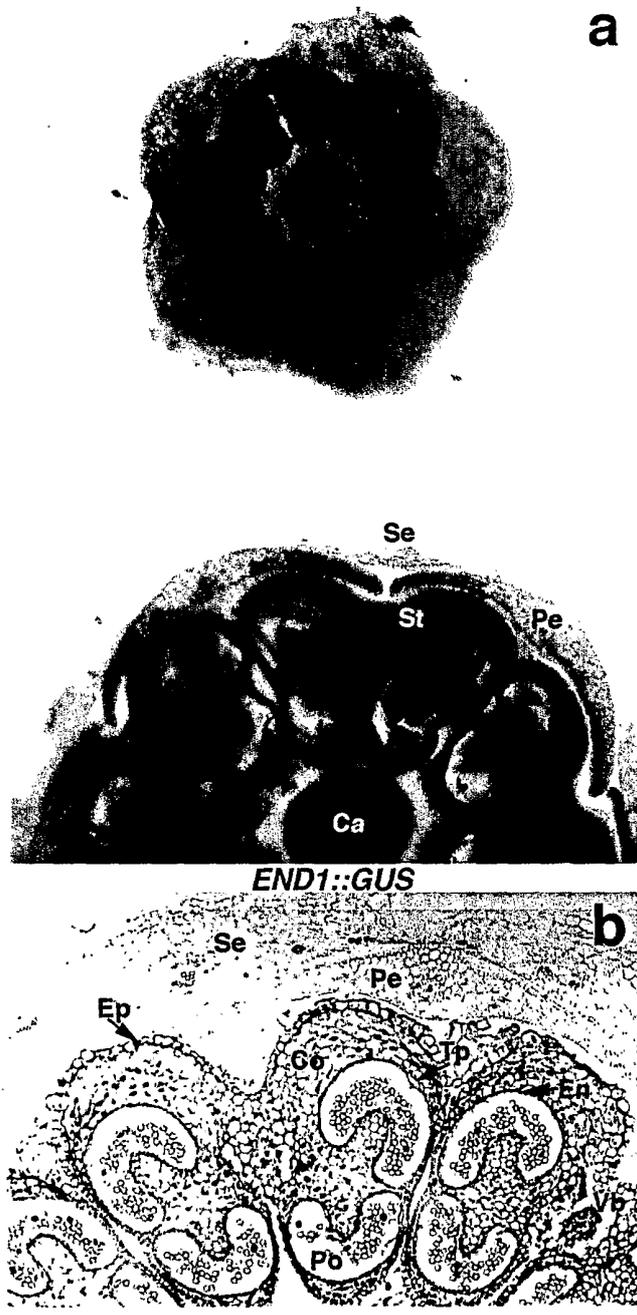


Figura 7

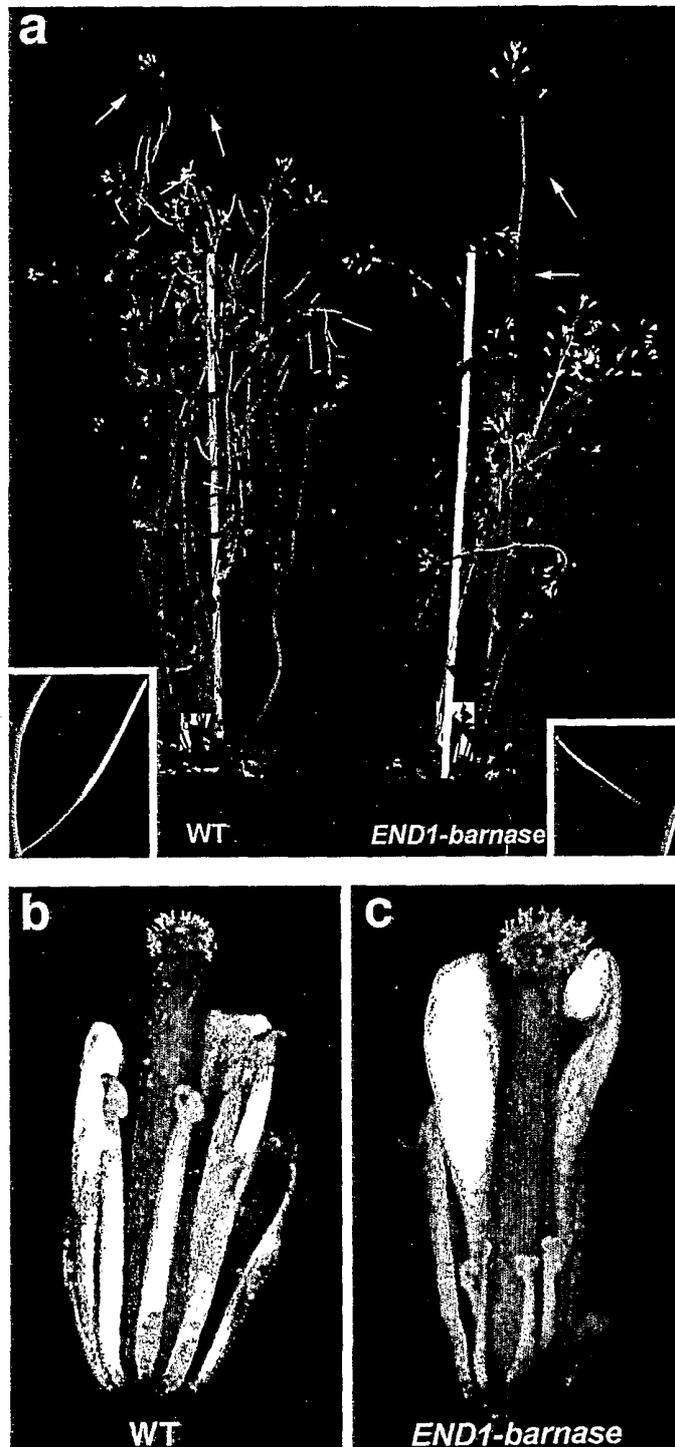


Figura 8

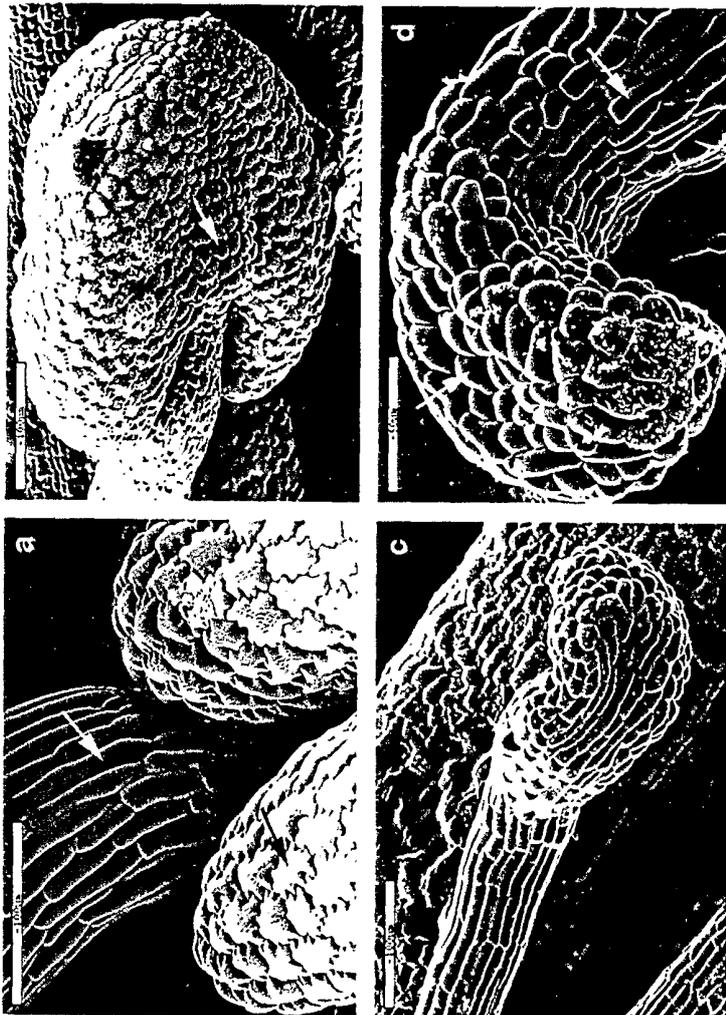


Figura 9

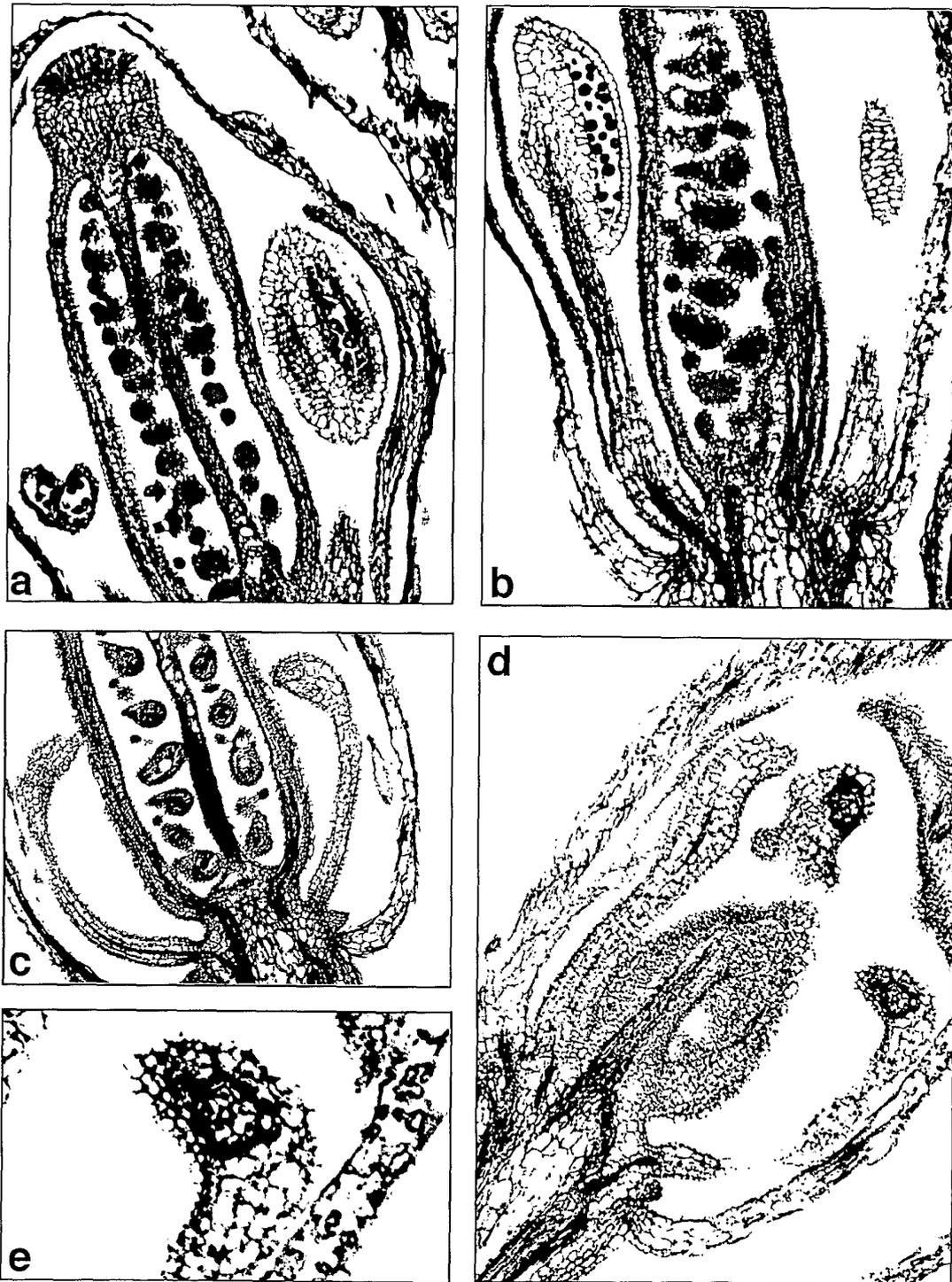


Figura 10

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

5 <120> Secuencia reguladora de la expresión específica en antera de un gen y su empleo en la producción de plantas androestériles y semillas híbridas

<130> región promotora de expresión antera

10 <140>
<141>

<160> 4

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 2766

20 <212> ADN
<213> Pisum sativum

<220>
<221> promoter

25 <222> (1)..(2736)

<220>
<221> TATA_signal
<222> (2474)..(2479)

30 <220>
<221> TATA_signal
<222> (2681)..(2688)

35 <220>
<221> CAAT_signal
<222> (2336)..(2339)

<220>

40 <221> CAAT_signal
<222> ()..(2394)

<220>
<221> CAAT_signal

45 <222> ()..(2675)

<220>
<221> C_region
<222> (2408)..(2417)

50 <220>
<221> C_region
<222> (2437)..(2446)

55 <220>
<221> C_region
<222> Complement((2625)..(2634))

<220>

```

<221> GC_signal
<222> (2447)..(2453)

<220>
5 <221> allele
  <222> (2610)..(2615)

<220>
<221> STS
10 <222> (2230)..(2236)

<220>
<221> STS
  <222> (2449)..(2457)
15

<220>
<221> STS
  <222> (2490)..(2496)

<220>
<221> gene
  <222> (2737)..(2766)

<400> SEQ ID NO 1
25 gacttcaacc ttattagtga atggacaata aaggttataa gtccttttac tgtgaaagcc 60
   caccagtaac atcaccttgc ttatatcatt cagcttcttt ctagtaacat ttggaacgtg 120
   tttataacag aaaaaaaccc aaaaactctg aaaagactca cacttttctt atctccagtc 180
   cacctctcaa aaggaacaat ttccttcagc ttcttggttg gacacctgtt gagcacatat 240
   gctgcagtgg caacagtttc tccccacaaa gtgtaggaa gcttcttctc cttcagcatg 300
30 ttccttgtca tatcaagcaa agttcggttt tcaacaagac cattatgttg aggagtatat 360
   ggatcagtca cttcatgctc aattccattc tctttacaga acttcttgaa ctctgtagag 420
   ttatactcac ctccaccatc agttctgaga atcttcagaa gtctgaccac tttatttctc 480
   agccttgatt atgaatttct taaattcagc aaacacctcg tgtttgaatt ttataaggga 540
   taccatgctc atccttgtga actcatccat aaatgacata aagtattatt ccctcctagt 600
35 gaaaggtttg taatgggcca cacacataag aatgcactac tcctaaagca tgttttgctc 660
   tttgagctac ttttgatgaa aatggcagtc ttggttgctt ccctttcatg cacacattac 720
   atgacttttt tggtttctta attgtaggaa ttccacgtac cagtttcttt gaattcaaat 780
   tccctaagct cctaaagtcc aaatgaccaa atcttttgtt ccacaactca ctttccttca 840
   caacacttgt tgcgctaagg cattcagagt ctgcagtttt aacattcgcc ttgaatgttt 900
40 tactccttoc atgttctgac tccataatca acttctgata acagtcatac agcttcaaaa 960
   gaatgtcatt catggtaact ggaaatccct tttcaattaa ttgacctaca ctcatcagat 1020
   tgctcttcat gccagaacg taccaagacg ttctgaatta atgcagatatt tctattattc 1080
   ataatcactc taacattccc cattccttta gcatttagtt acttatcatc agcacatcta 1140
   atcttggttt tcttctctaga gtcaaaatca accagccatt tcttatttcc agtatgatgg 1200
45 tttgaacaac cagtggtccat atatcaccag tcttctatag acgcactatc ataactagaa 1260
   gccattaata gcacatgttc atcatggtgc tcagatcctt agaatgttca attgctacaa 1320
   cgatgtaatc aaactgatga gtaagagatc taagtacctt ctcaatgata ctttctcat 1380
   aaagagtttc tccatgagac ttcattctcat ttgtgatcag aatcactcta gagatgtagt 1440
   cagataactt ctcatgttgc ttcattgctta gattctcata ctgctcacgt agagactgaa 1500
50 gtttccactt ctacactgat gcatcactat cgtagacca caccagtctg tctcacacaa 1560
   ccttttccgt cattgaaatca acgattttct taaacaggtt cacatccaca cactgatgga 1620
   tgtagaacaa cgcattctga tccttcttcc tcatatcaca ctgagcattt ctttgccgat 1680
   ccggttgcat ttctagaagt gaagcataaa cttcgttgat gagatcaaga acatcttgag 1740
   caccaaataa cacacacatc tgaatcatcc aacgattcca gttggtgtcg tcgaacaatg 1800
55 gnagcntggt gcacagatcc acaacgatat attataantt ttgttttatg aaatttaaga 1860
   acaaatttcc attattctta aaatgtttac aactgatgtg agactgcaaa aggaataaag 1920
   atacaatttg ttcacaccac tcacttgcgt aaatataagt gagagttaat gagaaatact 1980
   aaaataccct ctaaaattat gaattaattc taacaatctc taatgttagt ataatccatt 2040
   aaacactttg atggcaggta taacaaggtg gtaagttagt gtatacatat taggctctta 2100

```

```

ttatTTTTat attatctctg cTTTTcttct tcatgttctc actaatatga tattatctcc 2160
cttccctaaa ttatttataat ttattagaaa aagagtttca ttttttaaaa atatattacc 2220
gtaatttttc aaaaaataaa atttaaataat attttataaa aaaattatTTt aataattttat 2280
ttacattaat gcataaatat aaataaatac tgtcatttaa tatttaacct tttacaata 2340
5 aattatattt atttaattca actaatataa gctaagttat ctcatccaac caattaaaaa 2400
gatcatttga aaataccttt ttatttagtt tgtggcggtt tcaactgtca aaaaaaagga 2460
atTTTTacga cgatataaat ttaaaccagc aaaaaattga agcagttaag cgaaccaact 2520
catggtatgt ggatatattt atctttgtcg tttatatcgg attcgaatct ctataatgat 2580
gaaaaattaa tatcaaactt taaataagaa cgtcatttat agagccattt tgggaaacac 2640
10 atatttcatg tacacgtgat tcgcaaattt ccaataactc tatatatagc cctcctcagt 2700
ttcatgcatt tgctcacaac ataaccttcc ttgaattcga tatctaccta agatgacaaa 2760
accagg 2766

```

```

15 <210> 2
    <211> 910
    <212> ADN
    <213> Pisum sativum

```

```

20 <220>
    <221> CDS
    <222> (17)..(706)

```

```

<400> SEQ ID NO 2
25 tcgatatcta cctaag atg aca aaa cca ggt tac att aat gct gct ttt cgt 52
    Met Thr Lys Pro Gly Tyr Ile Asn Ala Ala Phe Arg
        1 5 10

```

```

30 tca tct ttc aac ggc gaa cgt tac tta ttc atc gat gat aag tat gtg 100
    Ser Ser Phe Asn Gly Glu Arg Tyr Leu Phe Ile Asp Asp Lys Tyr Val
        15 20 25

```

```

35 ttg gta gat tat gca ccg gga acc cgc gac gat aag ctc tta aac ggg 148
    Leu Val Asp Tyr Ala Pro Gly Thr Arg Asp Asp Lys Leu Leu Asn Gly
        30 35 40

```

```

40 cct ctt cct ctt cct gct ggg ttt aaa tca ctt gat ggt aca gta ttt 196
    Pro Leu Pro Leu Pro Ala Gly Phe Lys Ser Leu Asp Gly Thr Val Phe
        45 50 55 60

```

```

45 gga acc tac gga gtt gac tgt gcc ttt gac acc gat aac gac gaa gca 244
    Gly Thr Tyr Gly Val Asp Cys Ala Phe Asp Thr Asp Asn Asp Glu Ala
        65 70 75

```

```

50 ttc atc ttt tat gag aac ttt act gct ctc ata aac tat gct cca cat 292
    Phe Ile Phe Tyr Glu Asn Phe Thr Ala Leu Ile Asn Tyr Ala Pro His
        80 85 90

```

```

55 act tac aat gac aaa atc atc tcg ggt ccg aag aaa atc tcg gac atg 340
    Thr Tyr Asn Asp Lys Ile Ile Ser Gly Pro Lys Lys Ile Ser Asp Met
        95 100 105

```

```

60 ttt cct ttt ttc aaa gga acc gtg ttt gaa aac ggg att gac gct gca 388
    Phe Pro Phe Phe Lys Gly Thr Val Phe Glu Asn Gly Ile Asp Ala Ala
        110 115 120

```

```

65 ttc agg tca act aag gag aaa gaa gtt tat tta ttc aaa gga gac ttg 436
    Phe Arg Ser Thr Lys Glu Lys Glu Val Tyr Leu Phe Lys Gly Asp Leu
        125 130 135 140

```

tat gct cgt ata gac tat gga aaa aac tat ctg gtt caa agt atc aag 484
 Tyr Ala Arg Ile Asp Tyr Gly Lys Asn Tyr Leu Val Gln Ser Ile Lys
 145 150 155
 5 aac att agc act ggg ttc cct tgt ttc act gga acc gtc ttt gaa aat 532
 Asn Ile Ser Thr Gly Phe Pro Cys Phe Thr Gly Thr Val Phe Glu Asn
 160 165 170
 10 gga gtg gat gct gct ttt gct tct cac agg acc aat gaa gca tac ttt 580
 Gly Val Asp Ala Ala Phe Ala Ser His Arg Thr Asn Glu Ala Tyr Phe
 175 180 185
 15 ttc aaa gga gat tac tat gca ctt gtc aag att agc ccg ggc gga ata 628
 Phe Lys Gly Asp Tyr Tyr Ala Leu Val Lys Ile Ser Pro Gly Gly Ile
 190 195 200
 20 gat gac tat att atc ggt ggt gtg aag ccc att ctt gag aat tgg cct 676
 Asp Asp Tyr Ile Ile Gly Gly Val Lys Pro Ile Leu Glu Asn Trp Pro
 205 210 215 220
 25 tct ctt cgt ggt ata ata cct cag aaa agt taaatgtggc tctctgtgtg 726
 Ser Leu Arg Gly Ile Ile Pro Gln Lys Ser
 225 230
 30 tgtgtgatat catcagtcaa gtatggtatt aagaataaag actattgttg tcgttgttgt 786
 gtgtttctttt ttcattgttg ttctagttct taatgtttgc ttatgttgtt catgtgaact 846
 atgtaatgac atgcactgtg tacgcgcaga gtgaaaataa tatattactg tgtatgttga 906
 ttac 910
 35 <210> 3
 <211> 230
 <212> PRT
 <213> Pisum sativum
 40 <400> SEQ ID NO 3
 Met Thr Lys Pro Gly Tyr Ile Asn Ala Ala Phe Arg Ser Ser Phe Asn
 1 5 10 15
 45 Gly Glu Arg Tyr Leu Phe Ile Asp Asp Lys Tyr Val Leu Val Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Pro Gly Thr Arg Asp Asp Lys Leu Leu Asn Gly Pro Leu Pro Leu
 35 40 45
 50 Pro Ala Gly Phe Lys Ser Leu Asp Gly Thr Val Phe Gly Thr Tyr Gly
 50 55 60
 55 Val Asp Cys Ala Phe Asp Thr Asp Asn Asp Glu Ala Phe Ile Phe Tyr
 65 70 75 80
 Glu Asn Phe Thr Ala Leu Ile Asn Tyr Ala Pro His Thr Tyr Asn Asp
 85 90 95

5

Lys Ile Ile Ser Gly Pro Lys Lys Ile Ser Asp Met Phe Pro Phe Phe
 100 105 110

5 Lys Gly Thr Val Phe Glu Asn Gly Ile Asp Ala Ala Phe Arg Ser Thr
 115 120 125

Lys Glu Lys Glu Val Tyr Leu Phe Lys Gly Asp Leu Tyr Ala Arg Ile
 130 135 140

10 Asp Tyr Gly Lys Asn Tyr Leu Val Gln Ser Ile Lys Asn Ile Ser Thr
 145 150 155 160

Gly Phe Pro Cys Phe Thr Gly Thr Val Phe Glu Asn Gly Val Asp Ala
 165 170 175

15 Ala Phe Ala Ser His Arg Thr Asn Glu Ala Tyr Phe Phe Lys Gly Asp
 180 185 190

20 Tyr Tyr Ala Leu Val Lys Ile Ser Pro Gly Gly Ile Asp Asp Tyr Ile
 195 200 205

Ile Gly Gly Val Lys Pro Ile Leu Glu Asn Trp Pro Ser Leu Arg Gly
 210 215 220

25 Ile Ile Pro Gln Lys Ser
 225 230

30 <210> 4
 <211> 1561
 <212> ADN
 <213> Pisum sativum L.

35 <220>
 <221> promoter
 <222> (1)..(1561)

<400> SEQ ID NO 4

40 acaaccagtg tccatatatc accagtcttc tatagacgca ctatcataac tagaagccat 60
 taatagcaca tgttcatcat ggtgctcaga tccttagaat gttcaattgc tacaacgatg 120
 taatcaaaact gatgagtaag agatctaagt accttctcaa tgatactttc ctcataaaga 180
 gtttctccat gcgacttcat ctcatatttg atcagaatca ctctagagat gtagtcagat 240
 aacttctcat tgttcttcat gcttagattc tcatactgct cacgtagaga ctgaagtttc 300
 accttctaca ctgatgcac actatcgtag caccacacca gtctgtctca cacaacctt 360

45 tccgtcattg aatcaacgat tttcttaaac acggtcacat ccacacactg atggatgtag 420
 aacaacgcat tctgacctt cttcctcata tcacactgag catttctttg cgcacccgtt 480
 gcattttcta gaagtgaagc ataaacttcg ttgatgagat caagaacatc ttgagcacca 540
 aataacacac acatctgaat catccaacga ttccagttgt tgtcgtcgaa caatggnagc 600
 ntgggtgcaca gattcacaac gatataattat aanttttgtt ttatgaaatt taagaacaaa 660

50 tttccattat tcttaaaatg tttacacact gatgtagact gcaaaaggaa taaagataca 720
 atttggtcac accactcact tgcgtaaata taagttagag ttaatgagaa atactaaaat 780
 accctctaaa attatgaatt aattctaaca atctctaag ttagtataat ccattaaaca 840
 ctttgatggc aggtataaca aggggtgtaag ttagtgata catattaggc tcttattatt 900
 tttatattat ctctgctttt cttcttcatg ttctcactaa tatgatatta tctcccttcc 960

55 ctaaattatt tatatttatt agaaaaagag tttcattttt taaaaatata ttaccgtaat 1020
 ttttcaaaaa ataaaattta aatatatttt ataaaaaat tatttaataa tttatttaca 1080
 ttaatgcata aatataaata aatactgtca tttaatattt aaccttttaa caataaatta 1140
 tattttattt attcaactaa tataagctaa gttatctcat ccaaccaatt aaaaagatca 1200
 tttgaaaata cctttttatt tagtttgtgg cggtttcaac tgtcaaaaaa aaggaatttt 1260

```
tacgacgata taaatttaaa ccagcaaaaa attgaagcag ttaagcgaac caactcatgg 1320
tatgtggata tatttatctt tgcggtttat atcggattcg aatctctata atgatgaaaa 1380
attaatatca aactttaaat aagaacgtca tttatagagc cttttggga aacacatatt 1440
tcatgtacac gtgattcgca aattccaat aactctatat atagccctcc tcagtttcat 1500
5 gcatttgctc acaacataac cttccttgaa ttcgatatct acctaagatg acaaaaccag 1560
g 1561
```

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES 01/00127

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER :

IPC7 : C12N 15/82, 15/29, 5/10, A01H 5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC7 : C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, WPI, HCAPLUS, BIOSIS, AGRICOLA, CABA, STRAND

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A | EP 578611 A1 (CIBA-GEIGYAG) 12 January 1994 (12.01.94) | 1-12 |
| A | WO 9325695 A1 (PLANT GENETIC SYSTEMS N.V.) 23 Decembre 1993 (23.12.93) | 1-12 |
| A | WO 9626283 A1 (PLANT GENETIC SYSTEMS N.V.) 29 August 1996 (29.08.96) | 1-12 |

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
11 July 2001 (11.07.01)

Date of mailing of the international search report
19 July 2001 (19.07.01)

Name and mailing address of the ISA/
S.P.T.O.
Facsimile No.

Authorized officer
Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/ES 01/ 00127

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| EP 578611 | 12.01.1994 | CA 2099482 | 03.01.1994 |
| | | BR 9302735 | 12.01.1994 |
| | | HU 68406 | 28.06.1995 |
| | | US 5477002 | 19.12.1995 |
| ----- WO 9325695 | ----- 23.12.1993 | ----- CA 2137559 | ----- 23.12.1993 |
| | | CA 2148483 | 11.05.1994 |
| | | WO 9409836 | 11.05.1994 |
| | | AU 5457494 | 24.05.1994 |
| | | EP 644943 | 29.03.1995 |
| | | EP 668786 | 30.08.1995 |
| | | US 5550060 | 27.08.1996 |
| | | US 5750867 | 12.05.1998 |
| | | US 5977433 | 02.11.1999 |
| ----- WO 9626283 | ----- 29.08.1996 | ----- CA 2213394 | ----- 29.08.1996 |
| | | AU 4940596 | 11.09.1996 |
| | | EP 811070 | 10.12.1997 |
| | | JP 11500617 T | 19.01.1999 |
| | | AU 715758 | 10.02.2000 |
| | | US 6025546 | 15.02.2000 |
| ----- | ----- | ----- | ----- |

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud nacional nº
PCT/ES 01/00127

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ C12N 15/82, 15/29, 5/10, A01H 5/00

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁷ C12N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, WPI, HCAPLUS, BIOSIS, AGRÍCOLA, CABA, STRAND

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

| Categoría* | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes | Relevante para las reivindicaciones n° |
|------------|--|--|
| A | EP 578611 A1 (CIBA-GEIGYAG) 12.01.1994 | 1-12 |
| A | WO 9325695 A1 (PLANT GENETIC SYSTEMS N.V.) 23.12.1993 | 1-12 |
| A | WO 9626283 A1 (PLANT GENETIC SYSTEMS N.V.) 29.08.1996 | 1-12 |

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 11 julio 2001 (11.07.2001)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

19 JUL 2001 19. 07. 01

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.
n° de fax +34 91 3495304

Funcionario autorizado

Marta Hdez. Cuéllar

n° de teléfono + 34 91 349 55 45

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Sol internacional nº

PCT/ES 01/ 00127

| Documento de patente citado en el informe de búsqueda | Fecha de publicación | Miembro(s) de la familia de patentes | Fecha de publicación |
|---|----------------------|--------------------------------------|----------------------|
| EP 578611 | 12.01.1994 | CA 2099482 | 03.01.1994 |
| | | BR 9302735 | 12.01.1994 |
| | | HU 68406 | 28.06.1995 |
| | | US 5477002 | 19.12.1995 |
| WO 9325695 | 23.12.1993 | CA 2137559 | 23.12.1993 |
| | | CA 2148483 | 11.05.1994 |
| | | WO 9409836 | 11.05.1994 |
| | | AU 5457494 | 24.05.1994 |
| | | EP 644943 | 29.03.1995 |
| | | EP 668786 | 30.08.1995 |
| | | US 5550060 | 27.08.1996 |
| | | US 5750867 | 12.05.1998 |
| | | US 5977433 | 02.11.1999 |
| | | WO 9626283 | 29.08.1996 |
| AU 4940596 | 11.09.1996 | | |
| EP 811070 | 10.12.1997 | | |
| JP 11500617 T | 19.01.1999 | | |
| AU 715758 | 10.02.2000 | | |
| US 6025546 | 15.02.2000 | | |